

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ :		(A2)	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/01636
C12N 15/29, C07K 14/42, C12N 15/62, A61K 38/16, 35/78, 47/48, C07K 19/00, C12Q 1/68 // A61K 45/05			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. Januar 1997 (16.01.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/02773		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 25. Juni 1996 (25.06.96)			
(30) Prioritätsdaten: 95109949.8 26. Juni 1995 (26.06.95) (34) Länder für die die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist:		EP DE usw.	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MADAUS AG KÖLN [DE/DE]; Ostmerheimer Strasse 198, D-51109 Köln (DE).		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LENTZEN, Hans [DE/DE]; Heinrich-Heine-Weg 15, D-51503 Rösrath (DE). ECK, Jürgen [DE/DE]; Siegfriedstrasse 138, D-64646 Heppen- heim (DE). BAUR, Axel [DE/DE]; Haus Gripswald, Ossum 13A, D-40668 Meerbusch (DE). ZINKE, Holger [DE/DE]; Hartenauer Strasse 49, D-64404 Bickenbach (DE).			
(74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Postfach 86 07 67, D-81634 München (DE).			

(54) Title: RECOMBINANT MISTLETOE LECTIN

(54) Bezeichnung: REKOMBINANTES MISTELLEKTIN (rML)

(57) Abstract

The invention concerns nucleic acid molecules coding for preproproteins which, after maturation, display the biological activity of the mistletoe lectin dimer, vectors containing these nucleic acid molecules, hosts transformed by these vectors and polypeptides and polypeptide dimers coded by these nucleic acid molecules. The polypeptides and polypeptide dimers according to the invention have many therapeutic applications. Therefore the invention further concerns immunotoxins and drugs containing the polypeptides and polypeptide dimers according to the invention. The invention further concerns diagnostic compositions which contain the nucleic acid molecules according to the invention and the polypeptides and polypeptide dimers and/or primers according to the invention which specifically hybridize on the nucleic acid molecules according to the invention. Finally, the invention concerns plant-protectives containing the polypeptides and/or polypeptide dimers according to the invention.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle, die Präproproteine codieren, die nach Reifung die biologische Aktivität des Mistellektindimers aufweisen, Vektoren, die diese Nucleinsäuremoleküle enthalten, mit diesen Vektoren transformierte Wirtz und Polypeptide bzw. Polypeptiddimere, die von diesen Nucleinsäuremolekülen codiert werden. Die erfindungsgemäßen Polypeptide bzw. Polypeptiddimere sind therapeutisch vielseitig anwendbar. Somit betrifft die Erfindung ferner Immuntoxine und Arzneimittel, die die erfindungsgemäßen Polypeptide bzw. Polypeptiddimere enthalten. Ferner betrifft die Erfindung diagnostische Zusammensetzungen, die die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle, die erfindungsgemäßen Polypeptide bzw. Polypeptiddimere und/oder Primer, die spezifisch an die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle hybridisieren, enthalten. Schließlich betrifft die Erfindung Pflanzenschutzmittel, die die erfindungsgemäßen Polypeptide und/oder Polypeptiddimere enthalten.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
RJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

REKOMBINANTES MISTELLEKTIN (rML)

Die Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle, die Präproproteine codieren, die nach Reifung die biologische Aktivität des Mistellektindimers aufweisen, Vektoren, die diese Nucleinsäuremoleküle enthalten, mit diesen Vektoren transformierte Wirte und Polypeptide bzw. Polypeptiddimere, die von diesen Nucleinsäuremolekülen codiert werden. Die erfindungsgemäß Polypeptide bzw. Polypeptiddimere sind therapeutisch vielseitig anwendbar. Somit betrifft die Erfindung ferner Immuntoxine sowie Arzneimittel, die die erfindungsgemäß Polypeptide bzw. Polypeptiddimere enthalten. Ferner betrifft die Erfindung diagnostische Zusammensetzungen, die die erfindungsgemäß Nucleinsäuremoleküle, die erfindungsgemäß Polypeptide bzw. Polypeptiddimere und/oder Primer, die spezifisch an die erfindungsgemäß Nucleinsäuremoleküle hybridisieren, enthalten. Schließlich betrifft die Erfindung Pflanzenschutzmittel, die die erfindungsgemäß Polypeptide und/oder Polypeptiddimere enthalten.

Mistelextrakte werden seit Jahrhunderten therapeutisch genutzt. Seit Anfang dieses Jahrhunderts werden Mistelpräparate zur Krebstherapie mit unterschiedlichem Erfolg angewandt [Bocci, 1993; Gabius et al., 1993; Gabius & Gabius, 1994; Ganguly & Das, 1994]. Hajto et al. [1989, 1990] konnte zeigen, daß die therapeutischen Effekte insbesondere durch sogenannte Mistellektine (Viscumine, *Viscum album* Agglutinine, VAA) vermittelt werden. Es wird neben einer cytotoxischen Wirkung heute insbesondere eine (unspezifische) Immunstimulation diskutiert, deren positive Effekte zur begleitenden Therapie und zur Nachsorge von Tumorpatienten ausgenutzt werden. Eine Steigerung der Lebensqualität bei solchen Patienten wird möglicherweise durch die Ausschüttung körpereigener Endorphine vermittelt [Heiny und Beuth, 1994].

Zahlreiche Untersuchungen *in vitro* [Hajto et al., 1990; Männel et al., 1991; Beuth et al., 1993] und *in vivo* [Hajto, 1986; Hajto et al., 1989; Beuth et al., 1991; Beuth et al., 1992], sowie klinische Studien [Beuth et al., 1992] belegen die er-

höhte Freisetzung von inflammatorischen Cytokinen (TNF- α , IL-1, IL-6) sowie eine Aktivierung von zellulären Komponenten des Immunsystems (T_H -Zellen, NK-Zellen).

Als aktives Prinzip der Mistelextrakte wird heute ein 60kDa Mistellektin-Protein angesehen, das auf biochemischen Weg aus Extrakten gewonnen werden kann [Franz et al., 1977; Gabius et al., 1992]. Das ML-Protein besteht aus zwei kovalent S-S verbrückten Untereinheiten, dessen A-Kette für eine enzymatische Inaktivierung von Ribosomen [Endo et al., 1988] und dessen B-Kette für die Carbohydratbindung verantwortlich ist. Die biologische Aktivität wird nach bisherigem Kenntnisstand hauptsächlich auf die Lektinaktivität der B-Kette zurückgeführt [Hajto et al., 1990].

Das Wissen um Struktur-Wirkungsbeziehungen des Mistellektins (ML) ist jedoch bis heute gering. So ist der Beitrag der einzelnen Ketten und deren unterschiedliche biochemische und enzymatische Aktivitäten zur beobachteten Wirkung bzw. den therapeutischen Effekten unklar. Erschwert wird die Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen durch Kontamination der Präparationen mit anderen Pflanzeninhaltsstoffen der Mistel [Stein & Berg, 1994]. Es wird eine Abhängigkeit der Aktivität von Extraktpräparaten von unterschiedlichen Zusammensetzungen der Extrakte, wiederum abhängig von der Art des Wirtsbaums (z.B. Apfel, Kiefer, Pappel) diskutiert [Hülsen et al., 1986]. Sowohl für Viscotoxine [Garcia-Olmedo et al., 1983; Mendez et al., 1990] als auch für die weiteren Viscumine (z. B. ML-2, ML-3) werden ähnliche Wirkungen postuliert [Eifler et al., 1994]. Selbst auf biochemischen Weg (Affinitätschromatographie) hochrein aufgereinigte ML Präparationen weisen eine bedeutende Heterogenität (Fig. 8) auf. Diese Heterogenität bezieht sich auf die biochemisch meßbaren Aktivitäten der Ketten, auf die hervorgerufenen *in vitro* und *in vivo* Effekte, wie auch auf die Proteinstrukturen selbst. Strukturvarianten werden für Glycosylierungen der ML A- und B-Kette sowie für Sequenzvariationen diskutiert. Gabius et al. [1992] und Dietrich et al. [1992] zeigen eine Sequenzvariabilität der A1 und A2-Ketten des ML-1.

Um die therapeutischen Wirkungen des Mistellektins genauer untersuchen zu können, ist dessen Reindarstellung als strukturell homogene Substanz wünschenswert. Ferner ist für die Fachwelt von Interesse, Mistellektin oder seine Bestandteile in großen Mengen in reiner Form herstellen zu können, um es/sie beispielsweise großtechnisch als wirksamen Bestandteil von Arzneimitteln einsetzen zu können. Diese Ziele konnten bisher durch die im Stand der Technik bekannten Verfahren nicht annähernd realisiert werden. Bei Isolierungen aus pflanzlichem Material wird nach dem derzeitigen Stand der Technik immer ein heterogenes Substanzgemisch erhalten.

Die Heterogenität pflanzlicher Mistellektin-Präparationen resultiert unter anderem aus der posttranslationalen Prozessierung des ML-1 in die Isoformen ML-2 und ML-3, sodaß Mistellektin-Präparationen in Abhängigkeit von Isolierungsmethodik oder Fermentationsdauer einem variierenden Gehalt von ML-1, ML-2 und ML-3 aufweisen (Jäggy et al. 1995). Jede der genannten Isoformen weist zudem noch eine weitergehende Mikroheterogenität auf, die in Fig. 8 am Beispiel des ML-1 durch isoelektrische Chromatofokusierung gezeigt ist.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war somit, Mistellektin in reiner Form und in Mengen zur Verfügung zu stellen, die eine großtechnische Verwertung erlauben. Die Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst.

Somit betrifft die Erfindung ein Nucleinsäuremolekül, das (a) ein Präproprotein codiert, das nach Reifung die biologische Funktion des Mistellektindimers aufweist und die in Fig. 4c dargestellte Nucleotidsequenz aufweist; (b) ein Fragment des Präproproteins gemäß (a) codiert, wobei das Fragment ein biologisch aktiver Bestandteil des Mistellektindimers ist; (c) sich durch die Degeneration des genetischen Codes vom Nucleinsäuremolekül gemäß (a) oder (b) unterscheidet; oder (d) unter stringenten Bedingungen mit dem Nucleinsäuremolekül gemäß (a), (b) oder (c) hybridisiert und die ein Polypeptid mit der in (a) oder (b) angegebenen biologischen Funktion bzw. Aktivität codiert.

In der Darstellung von Gensequenzen des Mistellektins können erstmals ausgehend von dieser Sequenz rekombinante, hochreine Einzelketten (rMLA, rMLB) erhalten werden, die *in vitro* reassoziiert werden können und so ein rML-Holoprotein ergeben, das proteinchemisch, enzymatisch und strukturell homogen ist. Das reassoziierte rekombinante Protein weist keine Variabilität und Mikroheterogenität, insbesondere hinsichtlich der Primärstruktur und der posttranslationalen Modifikationen (Glycosylierungen, Phosphorylierungen) auf und ist sowohl als Holoprotein, als Teilkette und in Form von Subfragmenten für therapeutische Zwecke besonders geeignet.

Unter einem "Fragment" eines Mistellektinpräproteins wird erfindungsgemäß jedes Fragment, also nicht nur ein natürlicherweise vorkommendes Fragment verstanden, das ein biologisch aktiver Bestandteil des Mistellektindimers ist. Zur Verdeutlichung wird darauf hingewiesen, daß der Fachmann unter einem derartigen biologisch aktiven Bestandteil des Mistellektindimers selbstverständlich auch solche Bestandteile versteht, die Bestandteile der einzelnen Ketten des Dimers sind. Somit sind natürlich auch einzelne Ketten oder Fragmente davon, die Bestandteil der in Fig. 4c dargestellten Sequenz sind, Gegenstand der Erfindung.

Der Begriff "natürlicherweise" in Verbindung mit "Bestandteil des Mistellektins" bedeutet erfindungsgemäß, daß das so gekennzeichnete Fragment entweder eine Kette des Mistellektindimers darstellt oder ein Subfragment der Kette ist, das natürlicherweise in der Kette vorkommt. Diese Fragmente sind vorzugsweise biologisch aktiv.

Unter "biologisch aktiv" wird erfindungsgemäß verstanden, daß diese Fragmente mindestens eine biologische Funktion der Ketten oder des Dimers wie in dieser Anmeldung beschrieben oder eine sonstige biologische Funktion der einzelnen Ketten oder des Dimers aufweisen. Außerdem wird unter "biologisch aktiv" auch eine pharmakologische und/oder immunologische Aktivität verstanden.

Mit Hilfe rekombinanter ML-Proteine ist zusätzlich die Untersuchung der Beiträge der einzelnen Domänen und Subdomänen experimentell erstmals möglich. Rekombinante ML-Proteine und rekombinante Untereinheiten/Teilketten sind die Grundlage entsprechender definierter Monosubstanzpräparate als Ersatz von Extraktpräparaten und standardisierten Extrakten.

Die Clonierung des Mistellektin codierenden Gens konnte auf der Basis einer neuen Clonierungsstrategie überraschenderweise bewerkstelligt werden, nachdem konventionelle Clonierungsstrategien versagt hatten:

Vom Mistellektin ML-1 sind eine Reihe von proteinchemischen Daten bekannt. Es sind dies neben Molekulargewicht und Untereinheitenstruktur insbesondere kurze N-terminale Peptide, deren Aminosäuresequenzen unabhängig von Dietrich et al. [1992] und Gabius et al. [1992] [siehe auch DE4221836] beschrieben worden sind. Es ist praktisch unmöglich, ausgehend von den N-terminalen Peptiden der A- bzw. B-Kette aufgrund von deren Aminosäurezusammensetzungen und dem damit verbundenen hohen Degenerationsgrad der ableitbaren Nucleinsäuresequenzen synthetische Oligonucleotide herzustellen, deren Degenerationsgrad ausreichend niedrig ist, um beim Screening von genomischen Genbibliotheken zur Identifikation von ML-Genfragmenten zu kommen. Dies gilt ebenfalls für cDNA-Genbanken, die ausgehend von *Viscum album* poly-(A+) RNA dargestellt wurden.

Die Polymerase-Kettenreaktion erlaubt die Amplifikation von DNA-Abschnitten, die zwischen bekannten Abschnitten liegen [Erlich et al., 1988]. Mit einem "sense"-Oligonucleotid ausgehend von N-Terminus von MLA und einem "antisense" Oligonucleotid N-terminal von MLB wäre eine Amplifikation des dazwischenliegenden Genabschnitts unter der Voraussetzung der Intronfreiheit des ML-Gens denkbar (Fig. 1a). In der Praxis zeigt eine Analyse der N-terminalen Sequenz der B-Kette, daß der Degenerationsgrad der denkbaren Kombinationen von Oligonucleotiden für eine erfolgreiche Durchführung dieses Ansatzes jedoch viel zu hoch ist. Dies begründet sich insbesondere aus der für eine Oligonucleotidkonstruktion ungünstigen Sequenz

des B-Ketten N-Terminus, wodurch eine Amplifikation von ML-Gensequenzen ausgehend von den bekannten Aminosäuresequenzbereichen nicht praktikabel ist (Fig. 1b).

Zur Clonierung des ML-Gens mit Hilfe einer veränderten PCR-Strategie wurde daher versucht, zur Konstruktion von Amplifikationsoligonucleotiden weitere Proteindaten, insbesondere auf der Basis von Verwandschaftsbeziehungen des Mistellektins zur Klasse der Typ I und Typ II Ribosomen-inaktivierenden Proteine (RIPs) [Stirpe et al., 1992] einfließen zu lassen. Basierend auf multiplen Alignments von (a) Typ I RIP-Proteinen und Ricin-A-Ketten sowie (b) den B-Ketten von Abrin und Ricin wurden an insgesamt 8 Sequenzbereichen konservierte Regionen identifiziert. Ausgehend von diesen Sequenzregionen und unter Einbeziehung von Codonnutzungstafeln verwandter Spezies wurden insgesamt 21 Oligonucleotide konstruiert und in verschiedenen Kombinationen zu mehr als 200 Amplifikationsexperimenten eingesetzt. In keinem Fall konnten jedoch spezifische Amplifikationsprodukte erhalten werden, obwohl die PCR-Bedingungen, was Annealing-Temperatur, Mg²⁺-Gehalt sowie Zyklusparameter betrifft, in weiten Grenzen variiert wurden.

Sowohl Screening von genomischen und cDNA-Banken als auch die Anwendung von PCR-Techniken erlaubten es somit nicht, aufgrund der angeführten Überlegungen zu spezifischen ML-DNA-Sequenzen zu gelangen.

Es wurde daher nach neuen Wegen gesucht, weitere strukturelle Eigenschaften der Ricin- und Abrin- Struktur in die Konstruktion der Amplifikationsoligonucleotide einfließen zu lassen.

Da der enzymatische Mechanismus von Ribosomen inaktivierenden Proteinen (RIPs), hier insbesondere dem TypII-RIP Ricin, dem des ML gleicht [Endo et al., 1988a +1988b], war nicht auszuschließen, daß auch strukturelle Übereinstimmungen auf der Ebene der funktionellen Primär- und Tertiärstrukturbereiche vorhanden sind. Ausgehend von der Kristallstruktur von Ricin [Katzin et al., 1991; Rutenber & Robertus, 1991; Weston et al., 1994] ergab eine Analyse der Kettenflexibilitäten in der

Ricin-A Kette einen Hinweis auf die geringe Mobilität des Arg180, das innerhalb eines konservierten Sequenzbereiches liegt. Weiterhin wurde eine Analyse der aufgrund der sterischen Anordnung des Kettenrückgrats gegebenen möglichen Aminosäuresubstitutionen in diesem Bereich des aktiven Zentrums unter Berücksichtigung der Substrat-wechselwirkungen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Überlegungen wurden nun mit einer Auswertung von umfassenden Sequenzalignments der Ricin-A-Kette und weiteren TypI RIPs in Bezug gebracht.

Mit der Erweiterung der Ergebnisse der Sequenzvergleiche durch die Einbeziehung struktureller Daten ergaben sich so Wahrscheinlichkeitsdaten für das Auftreten bestimmter Aminosäurereste an bestimmten Positionen. Dadurch wurde es möglich, eine Reihe von theoretischen ML-Aminosäuresequenzen für diesen Bereich zu postulieren und anhand dieser ein entsprechendes außergewöhnlich gering degeneriertes Oligonucleotide (RMLA2) zu konstruieren (Fig. 1c).

Es konnten nun mit der Kombination RMLA1 (ein degeneriertes Oligonucleotid, das aus der N-terminalen Aminosäuresequenz der MLA-Kette abgeleitet wurde; vgl. Fig. 1b) und dem durch obige Überlegungen konstruierten "active-site" Oligonucleotid RMLA2 bei definierten PCR-Parametern ausgehend von komplexer genomicscher ML-DNA Fragmente erhalten werden, nachdem alle diesbezüglichen alternativen Ansätze wie oben beschrieben ohne Ergebnis geblieben waren.

Die Vervollständigung der Sequenzinformation des Gens wurde nun über spezifische nichtdegenerierte Oligonucleotidprimer, abgeleitet aus der mit Clonierung und Sequenzierung des Fragments a (Fig. 3) vorhandenen Genteilsequenz des MLA, und degenerierten Oligonucleotiden, abgeleitet aus RIP I und Ricin/Abrin Sequenzalignments, mit Hilfe von weiteren PCR-Amplifikationen durchgeführt. Zur Konstruktion der degenerierten B-Ketten-Oligonucleotide wurden Sequenzalignments der B-Ketten der Ricine und Abrine herangezogen, wo ebenfalls einige Bereiche hoher Konservierung gefunden wurden.

Zur Darstellung der 5'- und 3'-Enden des Holoproteins, B-Ketten-Teilfragmente sowie der 5'- und 3'- nichttranslatierten Abschnitte wurde ausgehend von isolierter Mistel-RNA analoge cDNA durch reverse Transkription synthetisiert und mit Hilfe der RACE-Technik [Frohman et al., 1988] die entsprechenden Genabschnitte dargestellt. Nachdem eine Vielzahl sich jeweils überlappender Genfragmente vorhanden war (Fig. 3), wurden anschließend vollständige A-Ketten- und B-Ketten-Genabschnitte, jeweils ausgehend von komplexer genomischer Mistel-DNA wiederum durch spezifische PCR dargestellt. Die Gensequenzen von rMLA und rMLB, versehen mit terminalen Modifikationen, sind in Fig. 4a und Fig. 4b dargestellt. Die auch 5'- und 3'- nichttranslatierte Bereiche sowie Endopeptid- und Signalpeptid-codierende Genabschnitte umfassende vollständige ML-Gensequenz ist in Fig. 4c dargestellt.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls ist das Fragment die A-Kette des Mistellektins, die durch die in Fig. 4a (MLA) dargestellte Nucleotidsequenz codiert wird.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls ist das Fragment die B-Kette des Mistellektins, die durch die in Fig. 4b (MLB) dargestellte Nucleotidsequenz codiert wird.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Nucleinsäuremolekül, das ein DNA-Molekül ist.

Erfindungsgemäß wird unter "DNA-Molekül" sowohl ein genomicsches, wie auch ein cDNA-Molekül oder ein (semi)synthetisches DNA-Molekül verstanden. Verfahren zur Herstellung dieser verschiedenen DNA-Moleküle sind dem Fachmann in Kenntnis der erfundungsgemäßen Lehre bekannt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Nucleinsäuremolekül ein RNA-Molekül.

Die Erfindung betrifft ferner ein Nucleinsäuremolekül, das ein antisense-Strang zu einem der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle ist. Ein solcher antisense-Strang kann beispielsweise zum Zwecke der Transkriptionsinhibition und damit für Expressions- oder Regulationsstudien in der Pflanze eingesetzt werden.

Die Erfindung betrifft ferner einen Vektor, der mindestens ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül enthält.

Der erfindungsgemäße Vektor kann beispielsweise ein einziges erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül enthalten, das das gesamte Mistellektin-Präproprotein codiert. Sofern dieser Vektor ein Expressionsvektor ist, kann das Präproprotein in einem geeigneten transformierten Wirt prozessiert werden und die monomeren Einheiten können zum Mistellektindimer *in vivo* oder *in vitro* zusammengefügt werden. In einer anderen Ausführungsform ist der erfindungsgemäße Vektor ein Vektor, der lediglich zur Propagation der erfindungsgemäßen Nucleinsäure eingesetzt wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält der erfindungsgemäße Vektor sowohl ein Nucleinsäuremolekül, das die A-Kette des Mistellektins oder ein Fragment davon codiert, als auch ein Nucleinsäuremolekül, das die B-Kette oder ein Fragment davon codiert. Vorzugsweise sind die Fragmente der Monomere biologisch aktiv.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist der erfindungsgemäße Vektor ein Expressionsvektor. Dem Fachmann ist klar, wie er geeignete Expressionsvektoren für verschiedene Wirtsorganismen bereitstellt.

Erfindungsgemäß wurde zur heterologen Expression eine für die Mistellektin A-Kette codierende Sequenz durch spezifische PCR ausgehend von komplexer genomischer Mistel-DNA dargestellt. Über nicht-komplementäre Bereiche der eingesetzten Primer-Oligonucleotide wurden hierbei Translations-Kontrollelemente sowie Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen an-

gefügt, wodurch ausgehend von dem genomisch vorliegenden Präpromistellektin-Gen die Clonierung und getrennte Expression der Mistellektin A-Kette ermöglicht wurde.

Der 5'-Bereich der für rMLA codierenden Sequenz entsprechend der Aminosäurereste Tyrosin¹ - Tyrosin¹⁷ [Dietrich et al., 1992; Gabius et al., 1992] wurde unter Vorschaltung eines Translations-Startcodons als synthetisches Genfragment durch Hybridisierung und Clonierung zweier Oligonucleotide dargestellt. Hierdurch wurde eine Optimierung der Gensequenz hinsichtlich der Codon-Auswahl, wie sie für stark exprimierte Gene in *Escherichia coli* beschrieben ist [Gribskov et al., 1984], erzielt. Am 3'-Ende des synthetischen rMLA-Genfragments sowie am 5'-Ende des mittels PCR dargestellten rMLA-Genfragments wurde durch den gezielten Austausch des Tyrosin¹⁷-Codons von TAC zu TAT eine *Ssp* I - Restriktionsschnittstelle eingeführt, die eine Fusion der beiden rMLA-Genfragmente unter Darstellung des Vektors pML14-17 (Fig. 5) ermöglichte. Die für rMLA codierende Sequenz wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt (Fig. 4a). Zur Expression von rMLA in *Escherichia coli* wurde die Gensequenz aus dem Vektor pML14-17 isoliert und durch Insertion in den Expressionsvektor pT7-7 [Studier & Moffart, 1986] unter die Kontrolle des T7-RNA Polymerase Promoters sowie eines Transkriptionsterminators gestellt. Mit dem resultierenden Expressionsvektor pT7-MLA (Fig. 5) wurde der *E. coli* Expressionsstamm BL21 transformiert. Die Induktion der Genexpression ist durch das Auftreten einer Proteinbande entsprechend der nicht-glykosylierten, rekombinanten Mistellektin A-Kette gekennzeichnet, die eine relative Molekulmasse von 25 kDa besitzt. Nachweis und Identifizierung des rekombinanten Expressionsproduktes erfolgte durch Western-Blot Analyse unter Verwendung eines spezifischen anti-MLA-Antikörpers (Fig. 7).

Zur heterologen Expression der Mistellektin B-Kette wurde die vollständige, MLB codierende Sequenz durch spezifische PCR aus komplexer genomicscher *Viscum album* DNA amplifiziert, wobei über nicht-komplementäre Bereiche der eingesetzten Primer-Oligonucleotide Translationskontrollelemente sowie Erken-

nungssequenzen für Restriktionsendonukleasen eingeführt wurden (Fig. 6). Das resultierende 0,8 kbp PCR-Produkt wurde nach Clonierung im TA-Clonierungsvektor pCRII durch Insertion in den Expressionsvektor pT7-7 unter die Kontrolle von Transkriptionskontrollelementen gestellt und mit dem resultierenden Expressionsvektor pT7-MLB der Expressionsstamm *E. coli* BL21 transformiert.

Die Integrität der rMLB-codierenden Sequenz wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt (Fig. 4b). Der Nachweis der Expression erfolgte durch Western-Blot Analyse unter Verwendung eines spezifischen anti-MLB-Antikörpers (TB33, Tonevitsky et al., 1995), wobei 2h nach Induktion der Genexpression ein immunreaktives Protein mit einer relativen Molekülmasse von 31 kDa entsprechend der nicht-glykosylierten, rekombinanten Mistelkettin B-Kette auftrat (Fig. 7b). Eine Analyse der Zellfraktionen nach Gesamtzellaufschluß der *E. coli* Zellen zeigte eine Aufteilung der synthetisierten rMLB-Kette in einen löslichen Anteil im Überstand sowie einen unlöslichen "inclusion bodies" Anteil im Sediment des *E. coli* Zellaufschlusses, wobei 4 h nach Induktion der lösliche bzw. unlösliche Anteil jeweils 50 % der Gesamtausbeute betrug (Fig. 7b).

Ferner betrifft die Erfindung einen Wirt, der mit mindestens einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert ist.

Je nach Zielsetzung des Fachmannes kann mit dem erfindungsgemäßen Wirt lediglich eines der beiden Monomere oder die Kombination beider Monomere, vorzugsweise als assoziiertes Dimer hergestellt werden. Der erfindungsgemäße Wirt kann eine eukaryontische oder prokaryontische Zelle, eine transgene Pflanze oder ein transgenes Tier sein.

Vorzugsweise ist der erfindungsgemäße Wirt eine Sägerzelle, eine Pflanzenzelle, ein Bakterium, eine Pilzzelle, eine Hefezelle, eine Insektenzelle oder eine transgene Pflanze.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der erfindungsgemäße Wirt das Bakterium *E.coli*, eine *Aspergillus*-Zelle

oder eine Spodoptera-Zelle, vorzugsweise eine Spodoptera frugiperda-Zelle.

Die Erfindung betrifft ferner ein Polypeptid, das von dem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül oder dem erfindungsgemäßen Vektor codiert wird und/oder vom erfindungsgemäßen Wirt produziert wird.

Das erfindungsgemäße Polypeptid weist vorzugsweise die biologische Aktivität der A-Kette oder der B-Kette des Mistellektins auf. In anderen Ausführungsformen kann das erfindungsgemäße Polypeptid jedoch auch nur einen Teil der biologischen Aktivität oder gar keine biologische Aktivität mehr aufweisen. Unter "Teil der biologischen Aktivität" wird erfindungsgemäß entweder eine verminderte Aktivität und/oder eine Anzahl von Aktivitäten aus dem biologischen Aktivitätsspektrum verstanden. Das erfindungsgemäße Polypeptid kann auch ein Fragment der A- oder B-Kette sein, das eine der vorgenannten Eigenschaften aufweist.

Untersuchung der Eigenschaften von rMLA, rMLB und rML-Holoprotein

(I) Relative Molekülmassen und Struktur

Die relativen Molekülmassen wurden durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen und der anschließenden Proteinfärbung mittels Silber bzw. Coomassie-Brilliant-Blue bzw. durch immunologische Färbung im Rahmen einer Western-Blot Analyse bestimmt.

Überraschenderweise wurde hierbei gefunden, daß die rekombinante, nicht-glykosylierte Mistellektin A-Kette eine relative Molekülmasse von 25 kDa zeigt und sich damit signifikant von den natürlichen Mistellektin A-Ketten A₁ mit 31 kDa bzw. A₂ mit 29 kDa unterscheidet. Dieser Unterschied im relativen Molekulargewicht ist vor allem deshalb überraschend, weil im Stand der Technik davon ausgegangen wurde, daß die A-Kette nicht glykoliert ist. Die rekombinante Mistellektin B-Kette

weist eine relative Molekülmasse von 31 kDa auf und ist damit wesentlich leichter als die glykosylierte, natürliche Mistellektin B-Kette mit 36 kDa. (Fig. 7).

Die bei natürlichen ML-Proteinen auftretende Heterogenität aufgrund Glykosylierung und/oder Sequenzvariationen, die sich im SDS-Gel als breite Bande zeigt, tritt im Falle der rekombinanten Spezies in keinem untersuchten Fall auf.

Die relativen Molekülmassen des reassoziierten rMLA /rMLB Holoproteins (rML) addieren sich zu 56 kDa im Vergleich zu dem schwereren nML mit 65 - 67 kDa.

(II) Isoelektrische Homogenität

rMLA erweist sich als isoelektrisch homogenes Protein mit einen isoelektrischen Punkt von 6,8 im Gegensatz zu hochreinen natürlichen Mistellektin A-Ketten, die sich auf 4 Species mit isoelektrischen Punkten von 5,2; 5,4; 5,7 und 6,2 aufteilen. (Fig. 8).

rMLB erweist sich als isoelektrisch homogenes Protein mit einen isoelektrischen Punkt von 5,1 im Gegensatz zu natürlicher Mistellektin B-Kette, die sich auf mindestens 2 Species mit isoelektrischen Punkten von 7,1 und 7,3 aufteilt. (Fig. 8).

Es ergeben sich damit für das natürliche ML-Holoprotein eine Vielzahl von Molekülvarianten und -kombinationen (Fig. 8 unten), während sich für rekombinante Mistellektin-Proteine eine einheitliche Mobilität in der IEF Chromatofocussierung ergibt, was die Homogenität des rML gegenüber der Mikroheterogenität der natürlichen Proteinspezies dokumentiert.

(III) Enzymatische Aktivität von rMLA

Durch Einsatz immunaffinitätsgereinigter rMLA Präparationen in einem gekoppelten Transkriptions/Translationsassay wurde translationsinhibierende Aktivität für rMLA (isoliert aus dem löslichem Expressionsproduktanteil) und rMLA (isoliert aus unlöslichem "inclusion-bodies"-Anteil) nachgewiesen.

rMLA zeigt im Vergleich zu natürlicher Mistellektin A-Kette eine unterschiedliche Hemmcharakteristik in Bezug auf die Dosisabhängigkeit der Translationsinhibition sowie in Bezug auf die nicht-inhibierbare Translations-Restaktivität im verwendeten Retikulocyten-Lysat, sh. (Fig. 9). Die enzymatische Eigenschaft, die die Grundlage für die toxische Wirkung von ML-Holoproteinen darstellt, ist in rekombinannten Spezies signifikant reduziert.

(IV) Carbohydrat-bindende Aktivität von rMLB

rMLB-Ketten, die durch Renaturierung und Reoxidation aus den primären Expressionsprodukten dargestellt werden, wie auch die in vitro reassozierten rMLA/rMLB, rMLA/MLB und MLA/rMLB Holo-proteine zeigen Carbohydrat-bindende Aktivität, die durch "Enzyme-Linked-Lektin-Assay" (ELLA) durch Bindung an Carbohydrat-Matrices Asialofetuin oder Fetuin nachgewiesen werden kann. Die Carbohydrat-Spezifität der rekombinannten rMLB-Kette kann im ELLA-System unter kompetitiven Bedingungen für Galactose, β -Lactose, N-Acetyl-Galactosamin (GalNAc) und Sialinsäure (N-Acetyl-Neuraminsäure, NANA) bestimmt und quantifiziert werden. Der kompetitive ELLA zeigt hierbei überraschenderweise unterschiedliche Carbohydrat-Spezifitäten für nMLB und rMLB. Die Bindungsaffinität wird hierbei durch die systemspezifischen IC₅₀-Werte für die halbmaximale Verdrängung der Proteine vom immobilisierten Asialofetuin-Ligand durch Galactose (IC₅₀ nMLB: 4,5 mM; IC₅₀ rMLB: wegen zu geringer Wechselwirkung nicht bestimmbar), β -Lactose (IC₅₀ nMLB: 4,9 mM; IC₅₀ rMLB: > 70 mM), N-Acetyl-Galactosamin (IC₅₀ nMLB: 20,7 mM; IC₅₀ rMLB: 109 mM) oder vom immobilisierten Fetuin-Ligand durch Sialinsäure (IC₅₀ nMLB: 49,8 mM; IC₅₀ rMLB: 47,1 mM) beschrieben.

Während die als Galactose-spezifisches Lektin beschriebene nMLB-Kette wie erwartet mit Galactose und β -Lactose kompetitierbar ist, zeigt die rekombinante in *E. coli* dargestellte rMLB-Kette keine nachweisbare Wechselwirkung mit Galactose und eine geringe Wechselwirkung mit β -Lactose. Rekombinante rMLB besitzt dafür eine deutliche Affinität zu N-Acetyl-Galactosamin und Sialinsäure und zeigt damit im Vergleich zur pflanzlichen nMLB überraschenderweise eine deutliche Verschiebung der Carbohydrat-Spezifität zu einem N-Acetyl-Galactosamin/Sialinsäure-spezifischen Lektin. Im Hinblick auf die biologische Aktivität von rMLB und rMLB-enthaltenden Holoproteinen ergibt sich hieraus die Möglichkeit für ein im Vergleich zu pflanzlichen Mistellektin-Proteinen erweitertes oder unterschiedliches Liganden-, Rezeptor- oder Zielzellen-Spektrum.

In einer bevorzugten Ausführungsform weist das erfindungsgemäße Polypeptid mindestens eine chemische oder enzymatische Modifizierung auf.

Diese Modifizierung kann die gegebenenfalls vorhandene biologische Aktivität des Polypeptids verändern, erniedrigen oder erhöhen. Eine derartige Modifizierung kann z.B. nach der Translation und Isolierung des Polypeptids erfolgen. Andererseits können derartige Modifizierungen bei der chemischen oder semisynthetischen Herstellung des erfindungsgemäßen Polypeptids eingefügt werden. Diese Modifikationen können vom Fachmann nach an sich bekannten Verfahren eingefügt werden, um die pharmakologische Aktivität des Mistellektins zu verändern, vorzugsweise zu verbessern.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Polypeptid ein Fusionsprotein. Das Fusionsprotein weist vorzugsweise die vorstehend definierte biologische Aktivität auf.

Auch diese Ausführungsform des erfindungsgemäßen Polypeptids ist vorzugsweise darauf ausgerichtet, die pharmakologischen

Eigenschaften der Mistellektin-Polypeptide für weitere Targets auf zellulärer Ebene zu verändern und vorzugsweise zu verbessern.

Die Erfindung betrifft ferner ein Polypeptiddimer mit den biologischen Aktivitäten des Mistellektins, wobei die beiden Monomere von den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen codiert werden.

Unter "biologische Aktivität des Mistellektins" wird jede biologische Aktivität aus dem Spektrum der gesamten biologischen Aktivitäten des Mistellektins verstanden. Eine derartige Funktion ist z.B. die pharmakologische Wirkung des Mistellektins.

In zahlreichen humanen und murinen Tumorzelllinien induzierte pflanzliches Mistellektin-1 den Zelltod durch apoptotische Mechanismen (Janssen, 1993). Mistellektin-1 bzw. die B-Kette alleine induzierten die Freisetzung von Cytokinen aus peripheren mononukleären Zellen gesunder, humaner Blutspender (Hajto, 1990). Aus neutrophilen Granulocyten von Krebspatienten induzierte Mistellektin-1 die Sekretion von Superoxidanionen (Timoshenko, 1993). Mistellektin-1 induzierte die Expression der A-Kette des Interleukin-2-Rezeptors (CD25) bzw. des HLA-DQ-Antigens auf peripheren Lymphocyten gesunder, humaner Blutspender (Beuth, 1992). Nach Applikation von Mistellektin-1 in Mäuse wurde eine Zunahme der Thymuszellzahl, der Anzahl der cytotoxischen T-Lymphocyten (Lyt-2+) und der Helfer-T-Zellen (L3T4+) im Thymus und die Zahl der Peritonealmakrophagen, auch speziell derjenigen, die den Aktivierungsmarker MAC-3 trugen, gemessen (Beuth, 1994). Auch das Verhältnis L3T4+/Lyt2+ im Thymus der Versuchstiere wurde erhöht. Im peripheren Blut der Mäuse wurde die Dichte der Leukocyten, Lymphocyten, Monocyten im allgemeinen und speziell der Lymphocyten, die den Interleukin-2-Rezeptor als Aktivierungsmarker auf der Zelloberfläche exprimieren, sowie der Monocyten, die den Aktivierungsmarker MAC-3 exprimierten, nach Behandlung mit Mistellektin-1 gesteigert (Beuth, 1994). Im Blut von Krebspatienten erhöhte Mistellektin-1 die Dichte der T-Lymphocyten (CD4+, CD8+), der natürlichen Killerzellen und der B-Lymphocyten (Beuth, 1992).

Ferner wurde eine Erhöhung des endogenen Opiatmediators β -Endorphin im Blutplasma von Mammakarzinompatientinnen nach Applikation von Mistellektin-1 nachgewiesen (Heiny, 1994). Zudem wurde nachgewiesen, daß Mistellektin-1 die cytotoxische Wirkung von peripheren, natürlichen Killerzellen gegenüber K-562-Tumorzellen und die Dichte von großen, granulären Lymphocyten (LGL) im peripheren Blut erhöht (Hajto, 1989). Eine antimetastatische Aktivität von Mistellektin-1 auf Sarkom-Zellen in Mäusen wurde belegt (Beuth, 1991).

In einer anderen Ausführungsform weist das erfindungsgemäße Polypeptiddimer dasselbe Spektrum an biologischen Aktivitäten wie das natürliche Mistellektindimer auf.

(V) Biologische Aktivitäten des rekombinannten Mistellektins

Die Darstellung von rML-Holoproteinen unter Verwendung der getrennt rekombinant synthetisierten Einzelketten erfolgte ausgehend von gefalteten, löslichen Ketten oder ausgehend von denaturierten rMLA- und rMLB-Ketten im Rahmen einer Co-Faltung, wobei vorzugsweise rMLB mit einem molaren Überschuß rMLA in Anwesenheit eines Glutathion Redox-Systems und teilweise in Anwesenheit von Protein-Disulfid-Isomerase *in vitro* reassoziiert wurde. Das dem Heterodimer entsprechende rML- Holoprotein wurde unter Abtrennung freier rMLA und rMLA-Dimere durch Affinitätschromatographie an N-Acetyl-Galactosamin-Agarose oder Lactosyl-Agarose aus dem Reassoziationsansatz isoliert und gereinigt. Mit analogem Vorgehen wurden rMLA/rMLB (rML) und rMLA/nMLB Heterodimere-Holoproteine dargestellt.

Cytotoxische Aktivität

Die cytotoxische Wirkung als Beispiel einer biologischen Aktivität reassozierter Holoproteine wurde an einer humanen Monozytenleukämiezelllinie (MOLT4) getestet. Sowohl B-Kette (Oberflächenbindung) als auch A-Kette (enzymatische Ribosomen-inaktivierung) leisten Beiträge zum beobachteten cytotoxischen Effekt. Ein *in vitro* reasoziiertes rMLA/rMLB Holoprotein sowie ein *in vitro* reasoziiertes rMLA/nMLB Holoprotein wurde mit zwei Chargen natürlichem nML-Holoprotein verglichen. Die re-

kombinanten rMLA/rMLB und rMLA/nMLB Holoproteine zeigen vergleichbar hohe cytotoxische Eigenschaften mit IC₅₀-Werten um 10 - 30 pg/ml (Fig. 11), was die funktionelle Integrität und biologische Aktivität der unter Verwendung rekombinanter Ketten in vitro reassoziierten rML-Holoproteine dokumentiert. Zur Ausübung der cytotoxischen Aktivität ist hierbei die funktionelle Verknüpfung der B-Ketten mit einer enzymatisch aktiven A-Kette notwendig, da die isolierte rMLB-Kette überraschenderweise allein keine cytotoxische Aktivität zeigte. Eine bislang diskutierte cytotoxische Aktivität von pflanzlichen Mistellektin B-Ketten Präparationen ist demnach höchstwahrscheinlich auf einen residualen Gehalt von nML-Holoprotein zurückzuführen. Mit der rekombinanten Darstellung der Einzelketten besteht somit erstmals die Möglichkeit zur getrennten Beschreibung und Anwendung von Carbohydrat-bindender und enzymatischer Aktivität des Mistellektins.

Induktion von Apoptose

Die Fähigkeit zur Induktion von Apoptose als Beispiel einer biologischen Aktivität von Mistellektin wurde für das rekombinante rML-Holoprotein an der monocytären Zelllinie U937 nachgewiesen. Durch Behandlung der Zellen mit 70 pg/ml konnten hierbei nach 24 h die Induktion von Apoptose durch rML-Holoprotein nachgewiesen werden (Fig. 12). Bei Untersuchungen mit Mistellektin an MOLT-4 Zellen und Peripheren-Blut-Mononukleären-Zellen (PBMC) konnte gezeigt werden, daß im Niedrigdosis-Bereich die Induktion apoptotischer Vorgänge die Grundlage der cytotoxischen Aktivität des Mistellektins darstellt. Da in dem Konzentrationsbereich der niedrigen Cytotoxizität die Cytokin-Induktion erfolgt (Fig. 13, Fig. 14), ist eine Korrelation mit der Apoptose-induzierenden Aktivität plausibel. Dagegen wird im Hochdosis-Bereich sowie bei längerer Inkubationszeit die Apoptose durch nekrotische Effekte überdeckt. Eine Cytotoxizität als Folge der Apoptose konnte bei Behandlung der sensitiven MOLT-4 Zellen mit rekombinanter B-Kette nicht festgestellt werden, sodaß die biologische Aktivität der Apoptose-Induktion im Niedrigdosis-Bereich nur auf die Wirkung des Holoproteins zurückgeführt werden kann.

Immunstimulierende Aktivität

Die immunstimulierenden Wirkungen als biologische Aktivitäten von rekombinantem Mistellektin-Holoprotein wurde am Beispiel der Induktion einer Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Inferferon- γ (IFN- γ) Freisetzung aus menschlichen mononukleären Zellen gesunder Blutspender (PBMC-Modell) sowie am Beispiel der Induktion einer Interleukin-1 α (IL-1 α) und Interleukin-6 (IL-6) Freisetzung in einer Kokultur menschlicher, primärer Keratinocyten und Hautfibroblasten (skin² ZK1200-Modell) nachgewiesen. So zeigte sich im PBMC-Modell durch 3 - 48 ng/ml rekombinantes rML-Holoprotein eine dosisabhängige Freisetzung von TNF- α und IFN- γ , im skin²-Modell durch 0,25 - 8 ng/ml rekombinantes rML-Holoprotein eine dosisabhängige Freisetzung von IL-1 α und IL-6.

Alle genannten Cytokine sind relevante, stimulierende Mediatoren des menschlichen Immunsystems, denen zentrale Funktionen bei der Aktivierung vor allem der zellulären Immunantwort zu kommen.

Entgegen dem bisherigen Kenntnisstand, nach dem die immunstimulierende Aktivität hauptsächlich auf die Lektinaktivität der B-Kette zurückgeführt wird [Hajto et al., 1990], konnte mit der rekombinanten rMLB-Kette allein keine der o.g. Cytokin-Freisetzungen induziert werden. Die immunstimulierende Aktivität konnte im Niedrigdosis-Bereich ausschließlich durch funktionell verknüpftes rML-Holoprotein erzielt werden. Dieses überraschende Ergebnis läßt darauf schließen, daß immunstimulierende Präparationen pflanzlicher nMLB-Kette noch Spuren an nML-Holoprotein enthielten und eine der nMLB-Kette zugewiesene immunstimulierende Wirkung auf einen residualen Gehalt an nML zurückzuführen ist. Während die bisher beschriebenen Verfahren zur Präparation von nMLB demnach eine quantitative Abtrennung von Holoprotein nicht ermöglicht, besteht mit der rekombinanten Darstellung der Mistellektin-Einzelketten somit erstmals die Möglichkeit zur Untersuchung und Bereitstellung homogener Mistellektin B-Ketten Präparationen. Dies erlaubt erstmals die getrennte Beschreibung und Anwendung

der biologischen Aktivitäten von A- und B-Kette sowie eine Unterscheidung der biologischen Aktivitäten von Einzelketten und funktionell verknüpftem Holoprotein.

(VI) Biologische Aktivitäten der rekombinanten Mistellektin B-Kette (rMLB)

Als Marker für die Aktivierung immunkompetenter Zellen wurde die Induktion des Zelloberflächenproteins CD69 untersucht. CD69 erscheint als eines der ersten Zelloberflächen-Antigene nach Aktivierung von T-Zellen, B-Zellen und insbesondere von "natural killer"-Zellen (natürlichen Killerzellen, NK-Zellen). CD69 stellt hierbei einen Aktivierungsmarker der o.g. immunkompetenten Zellpopulationen dar, da das Zelloberflächenprotein nicht auf ruhenden Lymphocyten exprimiert wird. Zudem wurde für das induzierbare CD69-Oberflächenprotein eine fördernde Funktion für die cytolytische Aktivität der NK-Zellen und TcRy/δ T-Zellen nachgewiesen (Moretta et al., 1991).

Durch Flow Cytometrie (FACS) unter Verwendung eines anti-CD69 mAk konnte im Konzentrationsbereich von 1-100 ng/ml eine Aktivierung der mononukleären Zellen sowohl hinsichtlich des Auftretens von CD69 auf der Zelloberfläche als auch hinsichtlich des Anteils CD69-positiver Zellen festgestellt werden. Es zeigte sich hierbei eine glockenförmige Dosisabhängigkeitskurve, was auf eine Notwendigkeit der Vernetzung von zellulären Rezeptoren über beide Liganden-Bindestellen der rMLB-Kette hinweist. Eine cytotoxische Wirkung auf die hier untersuchten PBMC konnte auch in der höchsten Konzentration von 100 ng/ml rMLB nicht nachgewiesen werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform weist das erfindungsgemäße Polypeptiddimer als mindestens eines der Monomere ein chemisch oder enzymatisch modifiziertes erfindungsgemäßes Polypeptid oder ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein auf.

Durch Modifikationen können zum einen die Wirkungsstärken optimiert werden, als auch durch Ausschaltung einzelner Wirk-

qualitäten (z.B. Kohlenhydratbindungsstellen der B-Kette oder Glycosidaseaktivität der A-Kette) die therapeutischen Einsatzmöglichkeiten erweitert werden, indem eventuelle Nebenwirkungen ausgeschaltet werden. Polypeptide mit veränderten Eigenschaften können auch als Werkzeuge zur Aufklärung der Wirkmechanismen dienen. Für bestimmte Therapien kann es notwendig werden, die Antigenität und die Immunogenität der Polypeptide zu vermindern und/oder ihre pharmakokinetischen Eigenschaften zu optimieren, was durch den gezielten Austausch einzelner Aminosäuren möglich wäre.

Außerdem betrifft die Erfindung Antikörper oder Fragmente davon oder Derivate, die das erfindungsgemäße Polypeptide und/oder Polypeptiddimer spezifisch binden. Sie erkennen somit nicht das natürliche Mistellektin oder einzelne Ketten davon. Vorzugsweise binden die erfindungsgemäßen Antikörper Epitope, die von den Glycosylierungen der natürlichen Mistellektine maskiert werden. Die Antikörper können monoclonale, polyclonale oder (semi)synthetische Antikörper sein. Die Fragmente können beispielsweise Fab'-, F(ab)₂- oder Fv-Fragmente sein. Auch Antikörperderivate sind im Stand der Technik bekannt.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen Polypeptids oder Polypeptiddimers, wobei man den erfindungsgemäßen Wirt unter geeigneten Bedingungen züchtet und das so erhaltene Polypeptid oder Polypeptiddimer isoliert.

Dem Fachmann sind geeignete Bedingungen zur Züchtung und Isolierung des Wirtes bekannt. So kann beispielsweise das erfindungsgemäße Polypeptid oder Polypeptiddimer mittels eines geeigneten Expressionssystems aus dem Wirt ausgeschleust und im Medium gesammelt werden. Andererseits können die Polypeptide oder Polypeptiddimere in der Zelle verbleiben und aus dieser isoliert werden. Nachfolgend wird eine weitere bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens vorgestellt:

Zur Isolierung von rMLA erfolgte ein Gesamtzellauflösung mit einem geeigneten Expressionsvektor transformierter *E. coli*-

Zellen und eine Trennung löslicher von unlöslichen Zellbestandteilen durch Zentrifugation. Eine Analyse der Zellfraktionen zeigte, daß die rekombinante Mistellektin A-Kette in Abhängigkeit von den Expressionsbedingungen und der Expressionsdauer zu 5 - 50 % in löslicher Form bzw. zu 50 - 95 % in Form unlöslicher Proteinaggregate ("inclusion bodies") akkumuliert.

Das Auftreten von löslichen und unlöslichen Proteinen ergibt, wenn eine Rückfaltung bzw. Renaturierung der rMLA-Proteine möglich ist, mindestens zwei Verfahren zur Isolierung von rMLA. Das zu "inclusion bodies" aggregierte rMLA wurde nach Waschen der Sedimente zur Entfernung von *E. coli* Proteinen [Babbitt et al., 1990] unter denaturierenden Bedingungen gelöst und durch 90-fache Verdünnung in Faltungspuffer (50 mM Tris-HCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 8,0) rückgefaltet.

Es ergaben sich nach dieser Prozedur einerseits lösliche, gefaltete Proteinspezies, die wie in Fig. 9 dargestellt, ebenso wie die renaturierten, ursprünglich unlöslichen, denaturierten rMLA Spezies voll enzymatisch aktiv sind. Eine Isolierung der renaturierten rMLA kann wie auch die Isolierung der löslichen rMLA durch Immunaffinitätschromatographie unter Verwendung des spezifischen anti-MLA-Antikörpers TA5 (Tonevitsky et al., 1995) erfolgen.

Mit dem Vorliegen von rMLB in löslicher Form als auch in Form unlöslicher "inclusion bodies" ergeben sich zwei Verfahren zur Isolierung von rekombinanter Mistellektin B-Kette.

Zur Isolierung der löslichen rMLB-Kette aus dem stark reduktiven Milieu des *E. coli* Cytoplasmas erfolgt zur Ausbildung der intrachenaren Disulfidbrücken eine Inkubation in Anwesenheit eines Redox-Systems aus reduziertem und oxidiertem Glutathion sowie zur Stabilisierung aktiver Faltungsprodukte in Anwesenheit des Liganden β -Lactose. Aus dem Faltungsansatz wurde aktive, Carbohydrat-bindende rMLB-Kette durch Affinitätschromatographie an Lactosyl-Agarose oder N-Acetyl-Galactosamin-Aga-

rose in einem 1-Schritt-Verfahren selektiv isoliert bzw. gereinigt.

Zur Isolierung von rMLB aus dem unlöslichen, als "inclusion bodies" vorliegenden Expressionsproduktanteils wurde das Sediment des *E. coli* Gesamtzellaufschlußes zur Entfernung von *E. coli* Proteinen gewaschen [Babitt et al., 1990] und unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen gelöst. Die Renaturierung erfolgte durch Verdünnung in Anwesenheit eines Redox-Systems aus reduziertem und oxidiertem Glutathion sowie des Liganden β -Lactose, wobei aktive Carbohydrat-bindende rMLB-Kette durch Affinitätschromatographie an N-Acetyl-Galactosamin-Agarose oder Lactosyl-Agarose selektiv aus dem Renaturierungsansatz isoliert und gereinigt wurden.

Die Erfindung betrifft außerdem ein Arzneimittel, das das erfindungsgemäße Polypeptid oder das erfindungsgemäße Polypeptidmer und/oder das nachstehend beschriebene erfindungsgemäße Immuntoxin, gegebenenfalls zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger enthält.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide, ihre Assoziate oder Modifikationen eignen sich für vielfältige Anwendungen in der Krebs- und Infektionstherapie, entsprechend den für das natürliche Mistellektin bekannten pharmakologischen Eigenschaften.

Die immunstimulierenden Wirkungen lassen sich für die Tumorthерапie nutzen, indem durch direkte und/oder indirekte Stimulation die körpereigene Immunabwehr befähigt wird, den Tumor und eventuelle Metastasen wirksamer zu bekämpfen. Dasselbe gilt auch für Infektionen, insbesondere virale Erkrankungen.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können auch mit anderen Immunstimulanten, z.B. Interferonen, Cytokinen oder koloniestimulierenden Faktoren, in Kombination gegeben werden, um synergistische Wirkungen zu erzielen bzw. die notwendige Dosis der Kombinationspartner zu reduzieren und damit deren Nebenwirkungen zu vermindern.

In Kombination mit Cytostatika oder Bestrahlung läßt sich die Nebenwirkung der Leukopenie/Myelosuppression mildern oder vermindern, so daß die durch diese derzeit üblichen Behandlungs-

methoden hervorgerufene Schwächung des Immunsystems reduziert wird.

Die direkte cytotoxische Wirkung der Polypeptide mit Glycosidaseaktivität führt zu Apoptose von Tumorzellen und kann ebenfalls zur Therapie genutzt werden. Dieses Prinzip kann bei der Verwendung von Immunoxinen spezifischer gestaltet werden, wenn man die erfindungsgemäßen Polypeptide an geeignete Antikörper koppelt. Somit betrifft die Erfindung ferner Immunoxine, die mindestens ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder Polypeptiddimer umfassen. Beispielsweise kann eine Koppelung von aktiver A-Kette oder Holoprotein an Antikörper oder Fragmente hiervon mit proteinchemischen Methoden erfolgen. Solche Koppelungsverfahren sind dem Fachmann bekannt, die entsprechenden Konjugate vielseitig einsetzbar (Vitetta, 1993). Alternativ können auch entsprechend konstruierte Fusionsproteinkonstrukte zur Expression gebracht werden, die Antigen-bindende Domänen aus z.B. Antikörpern und zusätzlich cytotoxische Fragmente des erfindungsgemäßen Polypeptids enthalten.

Weiterhin lässt sich die Bildung von Metastasen verhindern, wenn die Bindung von Tumorzellen an andere Zellen inhibiert wird. Über kompetitive Lektinbindung kann mit dem erfindungsgemäßen Polypeptiden diese Bindung verhindert werden.

Die Erfindung betrifft ferner einen Primer und/oder ein Primerpaar, der/das spezifisch an das erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül bzw. an den komplementären Strang dazu hybridisiert.

Außerdem betrifft die Erfindung diagnostische Zusammensetzungen, die mindestens enthalten:

- a) das erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül;
- b) einen Primer und/oder ein Primerpaar, der/das spezifisch an das erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül bzw. an den komplementären Strang dazu hybridisiert; und/oder
- c) das erfindungsgemäße Polypeptid und/oder das erfindungsgemäße Polypeptiddimer.

Die erfindungsgemäße diagnostische Zusammensetzung kann in der Ausführungsform, die den Primer bzw. das Primerpaar enthält, dazu benutzt werden, Organismen nach der Existenz eines Lektingens abzusuchen, um so beispielsweise neue Lektingene aufzufinden, die gegebenenfalls pharmakologisch interessante Lektine codieren. Auch das in der erfindungsgemäßen diagnostischen Zusammensetzung enthaltene erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül kann, z.B. in Southern Blot-Verfahren oder Northern Blot-Verfahren, zum Absuchen von Organismen auf die Existenz von entsprechenden Lektingenen eingesetzt werden. Durch Variation der Hybridisierungsstringenz kann ferner nach verwandten Lektingenen gesucht werden. Das Polypeptid(dimer) kann z.B. verwendet werden, um Antikörper oder Antiseren zu generieren, mit denen nach z.B. an sich bekannten Verfahren entsprechende (Mistel)Lektine in verschiedenen Organismen detektiert werden können.

Schließlich betrifft die Erfindung ein Pflanzenschutzmittel, enthaltend das erfindungsgemäße Polypeptid und/oder das erfindungsgemäße Polypeptiddimer. Die erfindungsgemäßen Polypeptide, ihre Assoziate oder Modifikationen können entsprechend der für das pflanzliche Mistellektin diskutierten Funktion im Rahmen des Pflanzenschutzes benutzt werden. Hierbei wird die Funktion des Mistellektins aufgrund der Toxin-Eigenschaften als Freßschutz der Pflanze sowie aufgrund von Eigenschaften, die sich auf die Permeabilität und Konstitution von Membranen auswirken, als anti-viraler Schutz diskutiert.

Die Figuren zeigen

- Fig. 1 Konstruktion der primären Amplifikationsoligonucleotide
- Fig. 2 Primäres *Viscum album* ML-Amplifikationsprodukt
- Fig. 3 Clonierstrategie zur Darstellung des ML-Gens
- Fig. 4 Insertionen der Expressionsvektoren für rMLA und rMLB und vollständige ML-Gensequenz
- Fig. 5 Konstruktionsschema Expressionsvektor für rMLA
- Fig. 6 Konstruktionsschema Expressionsvektor für rMLB
- Fig. 7 Expression von rMLA, rMLB und immunologische Detektion

Fig. 8 IEF Chromatofocusierung von rMLA und rMLB vs. nat. ML

Fig. 9 Enzymatische Aktivität von rMLA (RIP)

Fig. 10 Carbohydrat-Bindecharakteristik von rMLB

Fig. 11 MOLT4-Zytotoxizität von rML

Fig. 12 Induktion von Apoptose durch rML

Fig. 13 Immunstimulierende Wirkung von rekombinantem Mistellektin im PBMC-Modell

Fig. 14 Immunstimulierende Wirkung von rekombinantem Mistellektin im skin²-Modell

Fig. 15 Induktion des Zelloberflächen-Markers CD69 in PBMC

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1

Konstruktion der primären Amplifikationsoligonucleotide

Das Mistellektin (ML) gehört zur der Klasse der Ribosomen-inaktivierenden Proteine [Stirpe et al., 1992], die eine in Pflanzen verschiedener taxonomischer Herkunft weit verbreitete Protein-Familie darstellt. ML wurde aufgrund der Aktivitäten seiner Unterheiten der Gruppe der Typ II Ribosomen-inaktivierenden Proteinen zugeordnet [Endo et al., 1988a].

Zur Ermittlung der ML-Gensequenz ist der naheliegende Ansatz des Durchmusterns von *Viscum album* cDNA- und genomischen Genbanken jedoch ungeeignet. So konnten in Genbanken aus *Viscum album* poly-A+ RNA trotz der Verwendung verschiedener DNA-Sonden keine ML-spezifischen Clone identifiziert werden. Mit der Annahme, daß die ML-Gensequenz keine Introns enthält, wurde deshalb eine PCR-Strategie angewandt. Da die N-terminalen Aminosäuresequenzen von der MLA- als auch der MLB-Kette bekannt waren [Dietrich et al., 1992; Gabius et al., 1992], erschien eine Amplifikation des MLA-codierenden Bereiches unter Verwendung von degenerierten, aus den bekannten Peptiden abgeleiteten Amplifikationsoligonucleotiden möglich (Fig. 1a). Während ein brauchbares Oligonucleotid mit geringem Degenerationsgrad aus dem N-Terminus der MLA-Kette abgeleitet werden

kann (RMLA1, Fig. 1b), ist es nicht möglich, entsprechende Oligonucleotide mit ausreichender Spezifität aus dem N-Terminus der MLB-Kette zu konstituieren (RMLB1, RMLB2, RMLB3, Fig. 1b).

Es mußten deshalb alternative Strategien entwickelt werden, die durch das Einbeziehen von Proteindaten verwandter Proteine das Ableiten von Amplifikationsoligonucleotiden aus noch unbekannten ML-Sequenzbereichen ermöglichte. So zeigte eine Aminosäuresequenz-Analyse von Typ I und Typ II Ribosomen-inaktivierenden Proteinen eine Anzahl konservierter Bereiche mit hoher Sequenz-Homologie. Fig. 1c zeigt den hohen Verwandschaftsgrad von Typ I und Typ II RIP am Beispiel des aktiven Zentrums von Ricin. Innerhalb des Sequenzmotivs MISEAARF wurde für E177 und R180 die Beteiligung am enzymatischen Mechanismus diskutiert [Kim et al., 1992; Lord et al., 1994]. Daraus wurde geschlossen, daß zumindest diese beiden Reste in der ML-Sequenz vorhanden sein könnten. Aus weiteren strukturellen Überlegungen hinsichtlich dem Vorhandensein einzelner Reste, wobei besonderes solche mit einem niedrigen Degenerationsgrad des Codon-Gebrauchs berücksichtigt wurden, resultierte die Konstruktion des Amplifikationsoligonucleotids RMLA2. Die Sequenz dieses Oligonucleotids ist in Fig. 1c dargestellt.

Beispiel 2

Darstellung von ML-Gen spezifischen DNA-Fragmenten

Hochmolekulare, genomische DNA wurde ausgehend von frischen *Viscum album* Blättern (Wirtsbaum *Populus wilsonii*) nach der Methode nach Baur et al. [1993] isoliert. Zur Darstellung von ML-Gen spezifischen DNA-Fragmenten durch PCR wurden je Amplifikationsansatz 100 ng genomische DNA eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte in einem Gesamtvolume von 50 µl, enthaltend PCR-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,25 mM dNTP, pH 8,3), 78 pmol Primer RMLA1 und 50 pmol (Ansatz 2) bzw. 100 pmol (Ansatz 1) RMLA2. Die PCR erfolgte mit Taq-DNA-Polymerase (1,5E/Ansatz) von Boehringer Mannheim mit einem

Biometra Thermocycler. Die PCR-Parameter waren: 1 min Denaturierung 90°C, 1 min Annealing 50°C, 1 min Elongation 72 °C bei insgesamt 30 Zyklen. Die Amplifikationsprodukte wurden durch 5%ige Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid analysiert (Fig. 2). Das in Ansatz 2 erhaltene spezifische Amplifikationsprodukt mit einer Größe von etwa 500 bp wurde durch Gelelution isoliert und der Clonierung in TA-Vektoren zugeführt.

Beispiel 3

Clonierungstrategie

Die Ableitung der zur primären PCR eingesetzten Amplifikationsoligonukleotide ist in Beispiel 1 (Fig. 1a), die Darstellung des primären Genfragments des *Viscum album* ML-Gens, im Folgenden als "a" bezeichnet, ist in Beispiel 2 (Fig. 2) gezeigt. Ausgehend von der Sequenz des clonierten Genfragments "a" und der Annahme, daß das ML-Gen keine Introns besitzt, war es nun möglich, sequenzspezifische 5'-Oligonukleotide abzuleiten, mit denen eine Amplifikation der Fragmente "b", "c", "d" und "e" ermöglicht wurde. Während das 3'-Oligonukleotid für "c" ebenfalls aus der DNA-Sequenz von "a" abgeleitet wurde, mußte die Konstruktion der degenerierten 3'-Primer zur Amplifikation der Genfragmente "b", "d", "e" und "g" durch Analyse homologer Bereiche von Typ I ("b") und Typ II ("d", "e", "g") RIP-Proteinen erfolgen. Hierbei wurde wiederum aus den Sequenzvergleichen innerhalb der Protein-Familien auf das Vorhandensein einzelner Reste geschlossen, wobei besonders Reste mit geringem Degenerationsgrad des Codon-Gebrauchs berücksichtigt wurden. Insbesondere die bekannten Ricin und Abrin cDNA- und abgeleitete Protein-Sequenzen wurden zur Konstruktion von etwa 50 ML-spezifischen Oligonukleotid-Kombinationen herangezogen. In Fig. 3 sind nur die Genfragmente gezeigt, die als spezifische Amplifikationsprodukte clonierbar waren und einer weiteren Analyse zugeführt werden konnten. Ausgehend von anderen Oligonukleotid-Kombinationen konnten keine ML-spezifischen Amplifikationsprodukte generiert werden. Die Darstellung der Genfragmente "f" (codierend für die MLA-

Kette) und "g" (codierend für die MLB-Kette) ist im Detail in Beispiel 5 und Beispiel 6 beschrieben.

Zur Analyse der 5'- und 3'-Regionen der translatierten und nicht-translatierten Sequenzbereiche des ML-Gens wurden Bedingungen zur 5'- und 3'-RACE [Frohmann et al., 1988] etabliert, die zur Generierung der Fragmente "h", "i" und "j" führte. Die Amplifikation des Fragments "j" mit RACE-PCR ist damit eine Alternative zur Darstellung von vollständigen MLB-Genfragmenten. Die RACE-Reaktionen wurden unter Verwendung von cDNA durchgeführt, die durch reverse Transkription von isolierter *Viscum album* Gesamt-RNA aus Mistelblättern (Wirtsbäum *Populus wilsonii*) präpariert wurde.

Beispiel 4

DNA-Sequenz und Translationsprodukte rMLA und rMLB

Die Insertionen der Expressionsvektoren pT7-MLA und pT7-MLB wurden durch Standardverfahren mittels "primer walking" Strategie (Ermittlung vollständig überlappender Sequenzen beider Stränge) unter Verwendung verschiedener ML-spezifischer Oligonucleotide sequenziert (Fig. 4 a, b). Die unterstrichenen Sequenzbereiche bezeichnen Restriktionsschnittstellen zur Clonierung in die pT7-Expressionsvektoren. Beide Genfragmente sind entsprechend dem Konstruktionsschema der Expressionsvektoren wie in Beispiel 5 und Beispiel 6 beschrieben modifiziert.

Fig. 4c zeigt die aus den bezeichneten Fragmenten abgeleitete vollständige ML-Gensequenz. Sie umfaßt auch 5'- und 3'-nicht-translatierte Bereiche sowie Endopeptid- und Signalpeptid-codierende Abschnitte.

Beispiel 5
Konstruktion des Expressionsvektors pT7-MLA

Zur heterologen Expression wurde die für die Mistellektin A-Kette codierende Sequenz durch spezifische PCR ausgehend von komplexer genomischer Mistel-DNA dargestellt und terminal modifiziert. Über nicht-komplementäre Bereiche der eingesetzten Primer-Oligonucleotide wurden hierbei Translations-Kontroll-elemente sowie Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen angefügt, wodurch ausgehend von dem genomisch vorliegenden Präpromistellektin-Gen die Clonierung und getrennte Expression der Mistellektin A-Kette ermöglicht wurde.

Fig. 5b zeigt die Darstellung von MLA-codierenden Gen-Fragmenten durch PCR. Zur Amplifikation der MLA-codierenden Gensequenz wurden 200 ng genomicsche *Viscum album* DNA, 1,5 mM (Ansatz 1) bzw. 2,5 mM (Ansatz 2) Magnesiumchlorid, 40 pmol von jedem Primer Oligonucleotid RML16 und RML17 in PCR-Puffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,25 mM von jedem dNTP, pH 8,3) in einem Gesamtvolume von 50 µl eingesetzt. Die PCR erfolgte unter Verwendung von Taq-Polymerase (1,5 E/Ansatz, Boehringer Mannheim) durch insgesamt 30 Zyklen des Temperaturprofils 1 min Denaturierung 94 °C, 1 min Annealing 52 °C, 1,5 min Elongation 72 °C. Die Amplifikationsprodukte wurden durch 1%ige Agarosegel-Elektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid analysiert (Fig. 5b) und durch Gelelution der Clonierung in TA-Vektoren zugeführt.

Der 5'-Bereich der für rMLA codierenden Sequenz entsprechend der Aminosäurereste Tyrosin¹ - Tyrosin¹⁷ [Dietrich et al., 1992; Gabius et al., 1992] wurde unter Vorschaltung eines Translations-Startcodons als synthetisches Genfragment durch Hybridisierung und Clonierung zweier Oligonucleotide dargestellt. Hierdurch wurde eine Optimierung der Gensequenz hinsichtlich der Codon-Auswahl, wie sie für stark exprimierte Gene in *Escherichia coli* beschrieben ist [Gribskov et al., 1984], erzielt. Am 3'-Ende des synthetischen rMLA-Genfragments sowie am 5'-Ende des mittels PCR dargestellten rMLA-Genfragments wurde durch den gezielten Austausch des Tyrosin¹⁷-Codons

von TAC zu TAT eine *Ssp I* - Restriktionsschnittstelle eingeführt, die eine Fusion der beiden rMLA-Genfragmente unter Darstellung des Vektors pML14-17 (Fig. 5) ermöglichte.

Die generierte vollständige, für rMLA codierende Sequenz wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt (Fig. 4a). Zur Expression von rMLA in *Escherichia coli* wurde die Gensequenz aus dem Vektor pML14-17 isoliert und durch Insertion in den Expressionsvektor pT7-7 unter die Kontrolle des T7-RNA Polymerase Promotors sowie Transkriptionsterminators gestellt. Mit dem resultierenden Expressionsvektor pT7-MLA (Fig. 5) wurde der *E. coli* Expressionsstamm BL21 transformiert.

Beispiel 6

Konstruktion des Expressionsvektors pT7-MLB

Zur heterologen Expression der Mistellektin B-Kette wurde die vollständige, MLB codierende Sequenz durch spezifische PCR aus komplexer genomicscher *Viscum album* DNA amplifiziert, wobei über nicht-komplementäre Bereiche der eingesetzten Primer-Oligonucleotide Translationskontrollelemente sowie Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen eingeführt wurden.

Fig. 6b zeigt die Darstellung des gesamten, rMLB vollständig codierenden Genfragments durch PCR. Die Amplifikation des rMLB-codierenden DNA-Fragments erfolgte ausgehend von jeweils 200 ng genomicscher *Viscum album* DNA in PCR-Ansätzen mit 50 pmol Primer-Oligonucleotid RML25 und 30 pmol (Ansatz 1) bzw. 10 pmol (Ansatz 2) Primer-Oligonucleotid RML26 in einem Gesamtvolume von 50 µl PCR-Puffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,25 mM von jedem dNTP, pH 8,3). Die PCR erfolgte unter Verwendung von Taq-Polymerase (1,5 E/Ansatz, Boehringer Mannheim) durch 30 Zyklen aus 1 min Denaturierung 94 °C, 1 min Annealing 52 °C und 1,5 min Elongation 72 °C. Die PCR-Produkte wurden durch 1%ige Agarosegel-Elektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid analysiert. Es resultierte ein 0,8 kbp PCR-Produkt, das durch Gelelution isoliert und der Clo-

nierung in TA-Vektoren zugeführt wurde. Durch Insertion in den Expressionsvektor pT7-7 wurde das rMLB-codierende Genfragment unter die Kontrolle von Transkriptionskontrollelementen gestellt und mit dem resultierenden Expressionsvektor pT7-MLB der Expressionsstamm *E. coli* BL21 transformiert. Die Integrität der PCR-generierten, vollständigen, für rMLB-codierenden Sequenz wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt (Fig. 4b).

Beispiel 7

Expression, immunologischer Nachweis, Rückfaltung und *in vitro* Reassoziation von rMLA und rMLB

(I) Expression von rMLA in *E. coli*

Zur Expression von rekombinanter Mistellektin A-Kette wurden 1000 ml LBamp-Medium in 2 Ltr. Schüttelkolben mit Schikanen mit 5 ml einer stationär gewachsenen LBamp-Vorkultur von *E. coli* BL21/pT7-MLA angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln kultiviert, wobei das Wachstum durch Trübungsmessung bei 578 nm verfolgt wurde. Die Genexpression wurde bei Erreichen einer Zelldichte entsprechend OD₅₇₈ ≈ 0,9 - 1,0 durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Zur Ernte wurden die Zellen 2 h nach Induktion durch Zentrifugation 20 min bei 5.000 rpm und 4 °C im GS-3 Rotor (Sorvall) sedimentiert und das Kulturmedium dēkantiert, wobei ausgehend von 1 Ltr. Kulturvolumen eine Zellmasse von 3 - 4 g (Feuchtgewicht) isoliert wurde.

Der Zellaufschluß erfolgte mittels French-Press (SLM Instruments), wozu das Zellsediment in 20 ml Aufschlußpuffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 1 mM PMSF, pH 8,0) resuspendiert und durch 2 French-Press Durchgänge bei 1.500 psi aufgeschlossen wurde. Durch eine anschließende Zentrifugation für 30 min bei 10.000 UpM und 4 °C im SS-34 Rotor (Sorvall) wurden unlösliche Zellbestandteile sowie enthaltene "inclusion bodies" sedimentiert und von den im Überstand verbleibenden löslichen *E. coli* Proteinen bzw. löslichen Expressionsprodukten getrennt.

Zur Analyse der Expression wurden gleiche Volumina der Zellaufschlußfraktionen durch 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Coomassie-Brilliant-Blau Färbung sowie durch Western-Blot unter Verwendung des MLA-spezifischen Antiserums TA5 untersucht (Fig. 7a). Die monoklonalen Antikörper TA5 (Tonevitsky et al., 1995) wurden vom Autor zur Verfügung gestellt. Wie auch die anderen hier verwendeten Antikörper sind sie durch Standardverfahren unter Verwendung des entsprechenden Immunogens (im Falle von Ta5 ist dies ML-1 oder MLA) darstellbar. Zum Nachweis der Expression wurden gleiche Volumen der löslichen Fraktion (Spur 2, 4, 6, 8) sowie der unlöslichen "inclusion bodies" Fraktion (Spur 1, 3, 5, 7) des *E. coli* Aufschlußes hinsichtlich des Gehaltes an rMLA untersucht. Zur Darstellung des Expressionsverlaufes wurden dabei Proben vor (Spur 1+2), 2 h (Spur 3+4), 4 h (Spur 5+6) und 6 h (Spur 7-8) nach Induktion der Genexpression eingesetzt. Die Expression ist schon 1h nach Induktion durch das Auftreten eines immunreaktiven 25 kDa Expressionsproduktes entsprechend rMLA gekennzeichnet, deren Expressionsmaximum bereits 2 h nach Induktion erreicht ist. Die Verteilung von rMLA auf die lösliche bzw. unlösliche Zellaufschlußfraktion beträgt 2 h nach Induktion jeweils ~50 %, wobei eine längere Expressionsdauer zu einer zunehmenden Bildung unlöslicher "inclusion bodies" führt.

(II) Isolierung von rMLA aus unlöslichen "inclusion bodies"

Das Sediment des *E. coli* Gesamtzellaufschlußes wurde zur Entfernung von *E. coli* Proteinen 2x mit je 20 ml STET-Puffer (50 mM Tris-HCl, 8 % (w/v) Sucrose, 50 mM EDTA, 1,5 % (v/v) Triton X-100, pH 7,4) nach Babitt et al. [1990] gewaschen. Das verbleibende Sediment mit den enthaltenen "inclusion bodies" wurde in 20 ml Denaturierungspuffer (6 M Guanidiniumchlorid, 100 mM DTT, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) durch Inkubation 16 h bei Raumtemperatur unter Schütteln gelöst.

Zur Renaturierung von rMLA wurde die im Denaturierungspuffer vorliegende Proteinlösung in das 90-fache Volumen Faltungspuffer (50 mM Tris-HCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 8,0) langsam ein-

getropft und 16 h bei Raumtemperatur unter Röhren inkubiert. Wieder ausgefallenes Protein wurde durch Zentrifugation 30 min bei 6.000 UpM und 4 °C im GS-3 Rotor (Sorvall) abgetrennt. Der rMLA-haltige Überstand wurde zur Lagerung auf 20 % (v/v) Glycerin eingestellt und bei 4 °C aufbewahrt.

(III) Reinigung von rMLA durch Immunaffinitätschromatographie

Zur 1-Schritt-Reinigung von rMLA (löslicher Expressionsproduktanteil bzw. rückgefaltetes Protein) durch Immunaffinitätschromatographie wurden 260 µg des gegen Mistellektin A-Kette gerichteten, monoklonalen Antikörpers anti-nMLA-IgG (TA5, Tonevitsky et al., 1995) an Protein-A-Sepharose CL4B (Sigma, Deisenhofen) kovalent nach der Methode von Harlow & Spur [1988] immobilisiert. Nach Inkubation der Immunaffinitätsmatrix mit der rMLA-Probe und Waschen der Matrix mit 10 Säulenbettvolumen Waschpuffer 1 (1 M NaCl, 10 mM Phosphat-Puffer, pH 7,0) und 10 Säulenbettvolumen Waschpuffer 2 (10 mM Phosphat-Puffer, pH 7,0) zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine wurde spezifisch gebundene rMLA mit Elutionspuffer (0,1 M Glycin, pH 2,5) eluiert. Die Elution erfolgte zur Rückstellung des pH-Wertes in eine Vorlage von 1 M Phosphat-Puffer, pH 8,0.

(IV) Expression von rMLB in *E. coli*

Zur Expression von rekombinanter Mistellektin B-Kette wurden 1000 ml LBamp-Medium in 2 Ltr. Schüttelkolben mit Schikanen mit 5 ml einer stationär gewachsenen LBamp-Vorkultur von *E. coli* BL21/pT7-MLB angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln kultiviert, wobei das Wachstum durch Trübungsmessung bei 578 nm verfolgt wurde. Die Genexpression wurde bei Erreichen einer Zelldichte entsprechend OD₅₇₈ ≈ 0,9 - 1,0 durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Zur Ernte wurden die Zellen 4 h nach Induktion durch Zentrifugation 20 min bei 5.000 UpM und 4 °C im GS-3 Rotor (Sorvall) sedimentiert und das Kulturmedium dekantiert.

Der Zellaufschluß erfolgte mittels French-PressTM (SLM Instruments), wozu das Zellsediment in 20 ml Aufschlußpuffer B (20 mM Phosphat-Puffer, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 7,2) resuspendiert und durch 2 French-Press Durchgänge bei 1.500 psi aufgeschlossen wurde. Durch eine anschließende Zentrifugation für 30 min bei 10.000 UpM und 4 °C im SS-34 Rotor (Sorvall) wurden unlösliche Zellbestandteile sowie enthaltene "inclusion bodies" sedimentiert und von den im Überstand verbleibenden löslichen *E. coli* Proteinen bzw. löslichem Expressionsprodukt getrennt.

Zum Nachweis der Expression wurden gleiche Volumina der Zellaufschlußfraktionen durch 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Coomassie-Brilliant-Blau Färbung sowie durch Western-Blot unter Verwendung des MLB-spezifischen Antiserums TB33 untersucht (Fig. 7b). Die monoklonalen Antikörper TB33 (Tonevitsky et al., 1995) wurden vom Autor zur Verfügung gestellt. Sie wurden unter Verwendung von Standardverfahren hergestellt. Entsprechende Antikörper sind für den Fachmann ebenfalls unter Verwendung von Standardverfahren mit ML-1 oder MLB als Immunogen darstellbar. Zum Nachweis der Expression wurden gleiche Volumen der löslichen Fraktion (Spur 2, 4, 6, 8) sowie der unlöslichen "inclusion bodies" Fraktion (Spur 1, 3, 5, 7) des *E. coli* Aufschlusses hinsichtlich des Gehaltes an rMLB untersucht. Zur Darstellung des Expressionsverlaufes wurden dabei Proben vor (Spur 1+2), 2 h (Spur 3+4), 4 h (Spur 5+6) und 6 h (Spur 7-8) nach Induktion der Genexpression eingesetzt. Die Western-Blot Analyse zeigte bereits 1 h nach Induktion das Auftreten einer immunreaktiven 31 kDa Proteinbande entsprechend rMLB, wobei das Expressionsmaximum 4 h nach Induktion erreicht wurde. 4 h nach Induktion verteilt sich die rMLB-Menge zu jeweils ~ 50% auf die lösliche bzw. unlösliche Fraktion des Zellaufschlusses. Längere Inkubationszeiträume führen zu einer zunehmenden Akkumulation exprimierter rMLB in Form unlöslicher "inclusion bodies".

(V) Isolierung von rMLB aus unlöslichen "inclusion bodies"

Das Sediment des *E. coli* Gesamtzellaufschlusses wurde zur Entfernung von *E. coli* Proteinen 2x mit je 20 ml STET-Puffer (50 mM Tris-HCl, 8 % (w/v) Sucrose, 50 mM EDTA, 1,5 % (v/v) Triton X-100, pH 7,4) nach Babbitt et al. [1990] gewaschen. Das verbleibende Sediment mit den enthaltenen "inclusion bodies" wurde in 20 ml Denaturierungspuffer (6 M Guanidiniumchlorid, 100 mM DTT, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) durch Inkubation 16 h bei Raumtemperatur unter Schütteln gelöst.

Zur Renaturierung von rMLB wurde die im Denaturierungspuffer vorliegende Proteinlösung in das 90-fache Volumen Faltungspuffer (20 mM Phosphat-Puffer, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 100 mM Glucose, 10 % (v/v) Glycerin, 10 mM β -Lactose, pH 5,5) langsam eingetropft und 16 h bei Raumtemperatur unter Rühren inkubiert. Wieder ausgefallenes Protein wurde durch Zentrifugation 30 min bei 6.000 UpM und 4 °C im GS-3 Rotor (Sorvall) von der löslichen, gefalteten rMLB-Fraktion abgetrennt.

(VI) Isolierung von rMLB durch Affinitätschromatographie an N-Acetyl-D-Galactosamin-Agarose

Zur Isolierung von aktivem, Carbohydrat-bindendem rMLB wurde eine N-Acetyl-Galactosamin-Agarose Affinitätsmatrix (PIERCE, USA) mit 10 Säulenbettvolumen Chromatographiepuffer (50 mM Phosphat-Puffer, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, 0,05 % (v/v) Tween®-20, pH 7,0) äquilibriert. Der Probenauftrag erfolgte durch "batch" Inkubation der Affinitätsmatrix in rMLB-haltigen Probenlösung für mind. 2 h bei 4 °C. Nach Waschen der Affinitätsmatrix mit Chromatographiepuffer zum Entfernen unspezifisch gebundener Proteine wurde gebundenes rMLB durch kompetitive Verdrängung mit 0,3 M N-Acetyl-Galactosamin in Chromatographiepuffer, pH 4,0 eluiert.

(VII) *In vitro* Reassoziation von Mistellektin-Ketten zur Darstellung des Holoproteins

Die Darstellung von rekombinantem Mistellektin-Holoprotein (rML) kann ausgehend von isolierten, gefalteten als auch ausgehend von denaturierten, im Zuge einer Co-Faltung renaturierten Mistellektin A- und Mistellektin B-Ketten erfolgen.

Zur Reassoziation von isolierten, gefalteten Einzelketten wurde isolierte Mistellektin B-Kette (nMLB oder rMLB) mit einem molaren Überschuß an rMLA in 20 mM Phosphat-Puffer, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,2 für 16 - 48 h bei 4 °C inkubiert. Zur Ausbildung der interchenaren Disulfidbrücke erfolgte die Inkubation in Anwesenheit eines Redox-Systems aus 6 mM Glutathion (Verhältnis reduziert zu oxidiert 5 : 1) oder 10 mM Glutathion (Verhältnis reduziert zu oxidiert 2 : 1) + 1 µM Protein-Disulfid-Isomerase (Boehringer Mannheim).

Zur Reassoziation ausgehend von denaturierten Einzelketten im Rahmen einer Co-Faltung wurde rMLA-Kette in 6 M Guanidiniumchlorid, 2 mM DTT, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 zu einer Konzentration von 2 mg/ml gelöst. Die rMLB-Kette wurde zur vollständigen Reduktion der Cysteinreste in 6 M Guanidiniumchlorid, 100 mM DTT, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 gelöst und nach einer Inkubation 20 min bei Raumtempertur auf 6 M Guanidiniumchlorid, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 mittels Gelpermeation an PD-10 (Pharmacia, Schweden) umgepuffert und auf eine Konzentration von 200 µg/ml eingestellt. Die Reassoziation erfolgte im Rahmen einer Co-Faltung von rMLB mit einem molaren Überschuß rMLA durch langsame 1:30 Verdünnung der Guanidinium-Lösungen in Kopplungspuffer (50 mM Natriumphosphat-Puffer, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, 100 mM Glucose, 20 mM Lactose, pH 8,0) und Inkubation für 16 h bei 4 °C. Zur Ausbildung der interchenaren Disulfidbrücke erfolgte die Inkubation in Anwesenheit eines Redox-Systems aus 2 mM Glutathion (Verhältnis reduziert zu oxidiert 1 : 1).

Die Kopplungsansätze wurden gegen Lagerungspuffer (50 mM Natriumphosphat-Puffer, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, 0,05 % (v/v) Tween®-20, pH 8,0) dialysiert. Nachweis und Identifizierung des gebildeten Heterodimers erfolgte durch SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen und anschlie-

ßende Western-Blot Analyse unter Verwendung spezifischer, monoklonaler Antikörper gegen Mistellektin A-Kette (TA5) bzw. Mistellektin B-Kette (TB33). Die Isolierung des gebildeten Holoproteins bzw. Abtrennung freier rMLA bzw. rMLA-Aggregate erfolgte durch Affinitätschromatographie an N-Acetyl-Galactosamin-Sepharose oder Lactosyl-Agarose wie unter (VI) beschrieben.

Beispiel 8

Isoelektrische Homogenität von rMLA und rMLB

1-2 µg rMLA, natürliches MLA, rMLB, natürliches MLB oder ML-Holoprotein wurden zusammen mit IEF-Proteinstandards (BioRad, USA) auf Servalyt PreNets IEF-Gelen (pH 3 -10, 125 x 125 mm, 150 µm, Serva Heidelberg) fokussiert. Zum Nachweis wurden die Proteine durch "semi-dry electroblotting" auf Nitrocellulose-Membranen (0,2 µm, Schleicher & Schüll, Dassel) immobilisiert. Die immunologische Färbung erfolgte mit Hilfe eines monoklonalen, MLA-spezifischen Antikörpers (TA5, Tonevitsky et al., 1995) für rMLA und nMLA bzw. mit Hilfe eines monoklonalen, MLB-spezifischen Antikörpers (TB33, Tonevitsky et al., 1995) für rMLB, nMLB und ML-Holoprotein. Immunkomplexe wurden unter Verwendung eines mit alkalischer Phosphatase konjugierten anti-Maus IgG-IgG (Sigma, Deisenhofen) und Umsetzung der Substrate NBT und BCIP angefärbt (Fig. 8).

Während sich hochreine pflanzliche Mistellektin A-Kette als auch hochreine Mistellektin B-Kette als isoelektrisch inhomogene Proteine mit isoelektrischen Punkten der nMLA von 5,2 : 5,4 : 5,5 : 6,2 bzw. der nMLB von 7,1 : 7,3 darstellt, erweist sich die rekombinante rMLA-Kette mit einem isoelektrischen Punkt von 6,8 als auch die rekombinante rMLB-Kette mit einem isoelektrischen Punkt von 5,1 als homogenes Protein (Fig. 8). Damit ergeben sich für das natürliche ML-Holoprotein eine heterogene Vielzahl von Molekülvarianten (Fig. 8, unten), während die einheitliche Mobilität rekombinanter Mistellektin-Proteine die Homogenität des rML gegenüber der Mikroheterogenität der pflanzlichen Mistellektine dokumentiert.

Beispiel 9**Nachweis der enzymatischen, Ribosomen-inaktivierenden Aktivität von rMLA**

Die Proteinkonzentration der mittels Immunaffinitätschromatographie gereinigten rMLA (rückgefaltet) und rMLA (löslich) sowie von natürlicher MLA-Kette (nMLA) wurde nach Bradford [1976] unter Verwendung eines BSA-Standards bestimmt.

Zum Nachweis und zur Quantifizierung der enzymatischen rRNA-N-Glycosidase-Aktivität von MLA wurde unter Verwendung des "TNT coupled reticulocyte system" (Promega, USA) ein nichtradioaktives Testsystem etabliert. Je Ansatz wurden gleiche Mengen (20 µl) des TNT-Systems 15 min bei 30 °C vorinkubiert. Zur Quantifizierung einer Translationsinhibition wurden den Kontrollansätzen 2 µl des entsprechenden Puffers bzw. den Testansätzen 2 µl steigender MLA-Verdünnungen (Konzentrationsbereich 350 - 0 pM) zugesetzt. Aus jedem Ansatz wurden im Abstand von 8 min 2 Proben entnommen und zum Abstoppen der Reaktion in flüssigem Stickstoff eingefroren. Als Maß für die Translations-Aktivität wurde die relative Luciferase-Menge (sqrt-cpm) durch einen Biolumineszens-Test mittels Szintillationsmeßgerät bestimmt. Für jeden Ansatz wurde hierbei die Differenz der gemessenen sqrt-cpm der beiden Zeitproben als Maß der relativen Translations-Aktivität ermittelt, wobei die Aktivität im Kontrollansatz ohne RIP auf 0 % Inaktivierungsrate (IAR) gesetzt wurde.

Durch Auftragung der relativen Translations-Inaktivierungsrate gegen die eingesetzten rMLA-Konzentrationen wurde mittels nichtlinearer Regression diejenige Proteinkonzentration ermittelt, die zu 50 % Inhibition der Translationsaktivität im Vergleich zum Kontrollansatz führt. Dieser IC₅₀-Wert stellt eine System-abhängige Größe dar, die einen Nachweis und die Quantifizierung der enzymatischen Aktivität von rMLA (löslich), rMLA (rückgefaltet) im Vergleich zu nMLA ermöglicht (Fig. 9).

Fig. 9 zeigt den Nachweis der enzymatischen, Ribosomen-inaktivierenden Aktivität der rekombinanten MLA-Kette, wobei sowohl durch Isolierung des löslichen Expressionsproduktanteils (rMLA löslich) als auch durch Rückfaltung des aus "inclusion bodies" isolierten Proteins (rMLA rückgefaltet) enzymatisch aktives Expressionsprodukt erhalten wird. rMLA (löslich) und rMLA (rückgefaltet) weisen mit IC₅₀-Werten von 10,7 ± 1,3 pM bzw. 15,6 ± 6,6 pM übereinstimmende Aktivitäten auf. Sie weisen damit eine niedrigere toxische Aktivität auf als die natürliche MLA-Kette (IC₅₀ 1,1 ± 0,7 pM).

Beispiel 10

Carbohydrat-bindende Aktivität der Mistellektin B-Kette

Der Nachweis der Carbohydrat-bindenden Aktivität der rekombinanten Mistellektin B-Kette sowie der Vergleich der Carbohydrat-bindenden Aktivitäten und Spezifitäten von rekombinanter und pflanzlicher Mistellektin B-Kette erfolgt durch "Enzyme-Linked-Lectin-Assay" (ELLA) in Anwesenheit kompetitierender Kohlenhydrate. Die Bindung der nMLB- und rMLB-Ketten erfolgte unter Verwendung einer immobilisierten Asialofetuin-Matrix an vornehmlich Galactose- und N-Acetyl-Galactosamin-Resten sowie unter Verwendung einer immobilisierten Fetuin-Matrix an vornehmlich Sialinsäure-Resten.

Zur Immobilisierung einer Kohlenhydrat-Matrix wurden 100 µl einer Lösung von 1,1 mg Asialofetuin (Sigma, Deisenhofen) bzw. 1,1 mg Fetuin (Sigma, Deisenhofen) in 11 ml PBS in Kavitäten von MaxiSorp C96 Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden) gegeben und 16 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen der Mikrotiterplatten 3 x mit 150 µl / Kavität PBS-T (10 mM Natriumphosphat-Puffer, 130 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween® 20, pH 7,2) wurde die Mikrotiterplatte zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit 200 µl/Kavität PBS-T-1% BSA (10 mM Natriumphosphat-Puffer, 130 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween® 20, 1 % (w/v) BSA, pH 7,2) für 1 h bei 36 °C inkubiert und anschließend wieder wie beschrieben gewaschen. Zum Test wurden 100 µl B-

Ketten haltiger Präparationen in einer Konzentration von 100 - 500 ng/ml, vorzugsweise von 400 ng/ml eingesetzt, wobei die Testkonzentration durch Probenverdünnungen in PBS-0,05% BSA (10 mM Natriumphosphat-Puffer, 130 mM NaCl, 0,05 % (w/v) BSA, pH 7,2) eingestellt wurde. Pro Testkonzentration und Kontrolle wurden 2-3 Replikas angelegt. Die Bestimmung des Leerwertes erfolgt mit PBS-0,05% BSA oder dem jeweiligen Präparationspuffer. Zur Bestimmung der Bindungsspezifitäten erfolgte die Probeninkubation in Anwesenheit freier, kompetitierender Zucker. Zur Verdrängung von rMLB, nMLB oder ML-Holoproteinen aus der Bindung an die Asialofetuin- bzw. Fetuin-Matrix wurde Galactose vorzugsweise im Konzentrationsbereich 0 - 280 mM, N-Acetyl-Galactosamin im Konzentrationsbereich 0 - 280 mM, Lactose im Konzentrationsbereich 0 - 140 mM oder Sialinsäure im Konzentrationsbereich 0 - 140 mM zugesetzt.

Die Platten wurden nach Beladung 2 h bei 36 °C inkubiert und anschließend wie beschrieben gewaschen. In die belegten Kavitäten wurde 100 µl/Kavität anti-Mistellektin-Serum aus Ziege (1:19800 Verdünnung des Serumpools in PBS-T-0,1% BSA-Tx (10 mM Natriumphosphat-Puffer, 130 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween® 20, 0,1 % (w/v) BSA, 1 % (v/v) Triton® X100, pH 7,2) gegeben, 2 h bei 36 °C inkubiert und anschließend wie beschrieben gewaschen. Zum Nachweis der Immunkomplexe wurde je belegte Kavität 100 µl anti-Ziege IgG-IgG, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (Sigma, Deisenhofen) in einer 1 : 3500 Verdünnung in PBS-1% BSA (10 mM Natriumphosphat-Puffer, 130 mM NaCl, 1 % (w/v) BSA, pH 7,2) zugegeben und 1 h bei 36 °C inkubiert. Die Kavitäten wurden anschließend 6 x mit 150 µl/Kavität PBS-T gewaschen. Zur Entwicklung wurden 100 µl/Kavität Substratlösung (1 o-Phenyldiamin-Tablette (Sigma, Deisenhofen) in 25 ml 65 mM Citronensäure, pH 5,0 + 10 µl 30 % Wasserstoffperoxid) zugegeben und 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von 100 µl/1 M Schwefelsäure/Kavität. Die Auswertung erfolgte durch Absorptionsmessung bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 690 nm und der Berechnung des IC₅₀-Wertes durch Beschreibung der Meßdaten mittels 4-Parameter-Fit.

Fig. 10 zeigt Auftragungen der im ELLA-System beobachteten Verdrängung von rMLB und nMLB vom immobilisierten Asialofetuinliganden durch steigende Mengen D-Galactose (Fig. 10a), β -Lactose (Fig. 10b) oder N-Acetyl-Galactosamin (Fig. 10c) sowie die Verdrängung vom immobilisierten Fetuinliganden durch steigende Mengen Sialinsäure (Fig. 10d). Die Bindecharakteristiken von nMLB und rMLB werden durch den IC₅₀ Wert entsprechend der halbmaximalen Verdrängung beschrieben.

Während die Carbohydrat-Bindung der pflanzlichen nMLB-Kette in erster Linie durch Galactose ($IC_{50} = 4,5 \text{ mM}$) und β -Lactose ($IC_{50} = 4,9 \text{ mM}$) kompetitiert werden kann, zeigt die rekombinante rMLB-Kette überraschenderweise eine deutlich veränderte Carbohydrat-Spezifität. Im Gegensatz zur nMLB ist die Carbohydrat-Bindeaktivität von rMLB nicht durch Galactose (IC_{50} nicht bestimmbar) und nur in geringem Maße durch β -Lactose ($IC_{50} > 70 \text{ mM}$) kompetitierbar. Neben der drastisch reduzierten Affinität gegenüber Galactose und β -Lactose weist die rekombinante rMLB-Kette jedoch eine deutliche Spezifität für N-Acetyl-Galactosamin ($IC_{50} 109 \text{ mM}$) auf. Eine weitere, für nMLB beschriebene Aktivität der Bindung an Sialinsäure-Liganden konnte auch für die rekombinante MLB-Kette nachgewiesen werden (Fig. 10d). Hierbei zeigen sich für die pflanzliche nMLB-Kette ($IC_{50} = 49,8 \text{ mM}$) und rekombinante rMLB-Kette ($IC_{50} = 47,1 \text{ mM}$) übereinstimmende Bindungsaffinitäten.

Gegenüber der pflanzlichen, in erster Line Galactose/ β -Lactose-spezifischen nMLB-Kette besitzt die rekombinant dargestellte rMLB-Kette eine deutlich unterschiedliche, auf die Seite der N-Acetyl-Galactosamin/Sialinsäure-Bindung verschobene Carbohydrat-Spezifität.

Beispiel 11

Bestimmung der Cytotoxizität *in vitro* reassozierter rML-Holoproteine auf humane lymphatische Leukämiezellen

Die Integrität des Mistellektin-Holoproteins wurde durch die quantitative Bestimmung der Cytotoxizität gegenüber der humangen mononukleären (lymphatischen) Leukämiezelllinie MOLT-4

(European Collection Of Animal Cell Cultures No. 85011413) nachgewiesen.

MOLT-4 Zellen wurden in serumfreiem MDC-1 Medium (PAN SYSTEMS, Aidenbach) kultiviert und für den Test auf eine Einstatzzell-dichte von $1,6 \times 10^5$ MOLT-4-Zellen/ml bei einer Viabilität >98 % eingestellt. Zur Bestimmung der Cytotoxizität wurden pro Kavität einer 96-Loch Mikrotiterplatte 90 µl einer MOLT-4 Zell-suspension entsprechend 18000 Zellen/Kavität eingesät und mit 10 µl der Probenlösung versetzt. Zum Test wurden Mistellektin-Holoprotein Präparationen (Chargen #220793 (Madaus) und BRAIN 12/94, die aus Mistelblättern oder Misteltee durch ein Standardverfahren an Lactosyl-Sepharose (Franz et al., 1977) isoliert wurden) sowie in vitro reassoziiertes rML Holoprotein im Konzentrationsbereich von 1-100 pg/ml entsprechend (1,6 fM - 1,66 pM) eingesetzt, wobei die Verdünnungsreihen in MDC-1 Zellkulturmedium erstellt wurden. Pro Probenkonzentration und Kontrolle wurden 6 Replikas angelegt.

Die Zellen wurden 72 h bei 37°C und 5 % CO₂ im begasten Brutschrank inkubiert. Die Quantifizierung des cytotoxischen Effektes erfolgte durch die Bestimmung der Viabilität der Zellen mit Hilfe eines löslichen Formazan-Farbstoffes nach der WST-1 Methode [Scudiero et al., 1988] unter Verwendung des entsprechenden Cell Proliferation Reagent WST-1 (Boehringer Mannheim).

Das rekombinante Holoprotein wie auch das chimäre Holoprotein rMLB/nMLA zeigen hinsichtlich der MOLT4-Cytotoxizität eine mit dem natürlichen Protein übereinstimmende biologische Aktivität mit IC-50 Werten um 10-30 pg/ml. Dagegen zeigt rMLB im getesteten Konzentrationsbereich (rMLB bis 1 ng/ml) keinerlei cytotoxische Aktivität.

Beispiel 12

Induktion von Apoptose am Beispiel der humanen Monocyten-Zelllinie U937 durch rekombinantes Mistellektin (rML)

Der Nachweis der Induktion apoptotischer Vorgänge durch rekombinantes Mistellektin (rMLA/rMLB) erfolgte hier durch Färbung der Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Hotz et

al., 1992). Die typischen apoptotischen Veränderungen der Kernmorphologie können dadurch im Mikroskop sichtbar gemacht und durch Auszählung von 500-1000 Zellen pro Probe quantifiziert werden. Die Verwendung von Serum-freiem Medium ist von Bedeutung für die Sensitivität des Assays, da die Anwesenheit von Serumproteinen die verfügbare Menge des Lektins drastisch reduziert (ca. um den Faktor 40 bei 10 % FCS, Ribereau-Gayon et al., 1995). Die Induktionszeit von 24h lässt eine direkte Korrelation mit dem MOLT-Assay nur bedingt zu, da der cytotoxische Effekt im Viabilitätsassay erst nach 72 h vollständig ausgeprägt ist, die Apoptose jedoch ein früher Effekt ist. Bei zu langer Inkubationszeit wird die Apoptose durch sekundäre Nekrose überdeckt.

Abb. 12 zeigt eine deutliche Erhöhung der Rate apoptotischer U937-Zellen nach Behandlung mit rekombinantem ML-Holoprotein. Bei 70 pg/ml ist die Zahl der apoptotischen Zellen nach 24 h in zwei verschiedenen Kulturen in Serum-freien Medien um den Faktor 3 erhöht. Das rekombinante Mistellektin besitzt also ebenso wie das natürliche Protein (Janssen et al., 1993) die Fähigkeit, den apoptotischen Zelltod zu induzieren.

Beispiel 13

Immunstimulierende Wirkung von rekombinantem Mistellektin im PBMC-Modell

Bei den Cytokinen TNF- α (Monocyten, Makrophagen) und IFN- γ (T-Helferzellen) handelt es sich um zentrale Mediatoren innerhalb des komplexen Netzwerkes des menschlichen Immunsystems.

Menschliche, mononukleäre Zellen (PBMC, enthalten Monocyten und Lymphocyten) aus gesunden Blutspendern wurden mittels FICOLL-PAQUE®-Dichthegradienten-Zentrifugation nach Vorgaben des Herstellers (Pharmacia, Schweden) isoliert.

Für die Induktion der Freisetzung von TNF- α wurden die Zellen (4×10^6 mononukleäre Zellen/ml) in RPMI 1640-Medium mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum, 100 E/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin zunächst 18 h mit den rekombinanten Mistellektin-Proteinen alleine und danach weitere 24 h mit 1 μ g/ml Lipopolysacchariden aus *Salmonella abortus equi* als costimulie-

rendem Faktor bei 37°C, 5% CO₂ und >95% relativer Luftfeuchtigkeit in U-förmigen Mikrotiter-Zellkulturplatten im Begangsbrutschrank inkubiert. Danach wurde in den zellfreien Überständen sofort mittels ELISA (Genzyme Diagnostics, Rüsselsheim) die Konzentration von TNF-α quantifiziert.

Für die Induktion der Freisetzung von IFN-γ wurden die Zellen in o.g. Medium zunächst 1 h mit den rekombinanten Mistellektin-Proteinen alleine und danach weitere 65 h mit 0,5 µg/ml Phytohämagglutinin-L als costimulierenden Faktor wie beschrieben inkubiert. Anschließend wurde in den zellfreien Überständen sofort mittels ELISA (ENDOGEN INC., Cambridge, USA) jeweils die Konzentration von IFN-γ quantifiziert.

Beispiel 14

Immunstimulierende Wirkung von rekombinantem Mistellektin im skin²-ZK1200-Modell

Das als Bioassay etablierte skin²-Modell besteht aus einer dreidimensionalen Fibroblasten-haltigen Dermis und einer strukturierten Epidermis aus unverhornten Keratinocyten in deren eigenen, natürlich sezernierten Matrix (Joller et al., 1996). Die Hautgewebe-Stückchen (11x11 mm², aus menschlichen, primären Zellen hergestellt; Advanced Tissue Sciences Inc. (ATS), La Jolla, USA) wurden jeweils auf einem Nylon-Gewebe-gitter in Agarose zur Verfügung gestellt und sofort nach Lieferung in Spezialmedium A (ATS, La Jolla, USA) überführt.

Sowohl IL-1α als auch IL-6 sind relevante, stimulierende Cytokine des menschlichen Immunsystems.

Für die Induktion der Freisetzung von IL-1α bzw. IL-6 wurden die skin²-Gewebestückchen jeweils mit der Prüfsubstanz in 2 ml des Spezialmediums B (ATS, La Jolla, USA) 24 h bei 37 °C, 5% CO₂ in Luft und > 95% relativer Luftfeuchtigkeit in 12-Napf-Zellkulturplatten (Corning Glass Works, Corning, USA) inkubiert. Danach wurde in den zellfreien Überständen mittels ELISA jeweils die Konzentrationen von IL-1α (Quantikine human IL-1α Assay, R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) bzw. IL-6 (h-Interleukin 6 ELISA, Boehringer Mannheim GmbH) quantifiziert.

Es zeigten sich im skin²-Modell eine dosisabhängige, durch 0,25 - 8 ng rML/ml induzierte Freisetzung von IL-1 α sowie eine dosisabhängige, durch 0,5 - 8 ng rML/ml induzierte Freisetzung von IL-6 (Fig. 14). Mit der rekombinanten rMLB-Kette allein konnte überraschenderweise keine der obengenannten Cytokin-Freisetzungen induziert werden, was im Gegensatz zum bisherigen Kenntnisstand steht, nach dem die immunstimulierende Aktivität hauptsächlich auf die Lektinaktivität der B-Kette zurückgeführt wurde (Hajto et al., 1990).

Beispiel 15

Aktivierung von immunkompetenten Zellen durch rekombinante Mistellektin B-Kette (rMLB)

Die Aktivierung immunkompetenter Zellen wurde anhand der Induktion des Zelloberflächenproteins CD69 untersucht. CD69 erscheint als eines der ersten Zelloberflächen-Antigene nach Aktivierung von T-Zellen, B-Zellen und insbesondere von "Natural Killer"-Zellen (NK-Zellen), denen aufgrund ihrer Befähigung, neoplastische Zellen zu erkennen und zu lysieren eine zentrale Bedeutung bei der natürlichen Tumorabwehr zukommt. CD69 stellt einen Aktivierungsmarker der o.g. immunkompetenten Zellpopulationen dar, da das Zelloberflächenprotein nicht auf ruhenden Lymphocyten exprimiert wird. Zudem wurde für das induzierbare CD69-Oberflächenprotein eine fördernde Funktion für die cytolytische Aktivität der NK-Zellen und TcR γ / δ T-Zellen nachgewiesen (Moretta et al., 1991).

Zum Nachweis des Oberflächenmarkers auf humanen mononukleären Zellen per Flow Cytometrie (FACS) wurden PBMC mittels eines Dichtegradienten an Hypaque (Sigma) ähnlich wie in Beispiel 13 isoliert. Nach Aufnahme der Zellen in RPMI 160 Medium mit 5 % FCS und Einsaat von ca. 250000 Zellen/Napf einer Mikrotiterplatte erfolgte eine 4-stündige Inkubation mit 1, 10, 30 und 100 ng der Testsubstanz rMLB. Der 20-minütigen Inkubation mit Fluoreszenz-markiertem anti-CD69 MAK im Eisbad folgte ein Waschvorgang in Hank's Solution mit 5% FCS. Die sedimentierten markierten Zellen wurden in 200 μ l "Sheath Fluid" aufgenommen und im FACScan (Becton Dickinson) gemessen. Aufgetragen ist

die mittlere Fluoreszenz entsprechend der Zahl der CD69-Zelloberflächenmarker pro Zelle sowie der Anteil CD69-positiver Zellen in der Zell-Gesamtpopulation.

Im Konzentrationsbereich von 1-100 ng/ml konnte eine Aktivierung der mononukleären Zellen sowohl hinsichtlich des Auftretens von CD69 auf der Zelloberfläche als auch hinsichtlich des Anteils CD69-positiver Zellen festgestellt werden. Es zeigte sich hierbei eine glockenförmige Dosisabhängigkeitskurve. Eine cytotoxische Wirkung auf die hier untersuchten PBMC konnte auch in der höchsten Konzentration von 100 ng/ml rMLB nicht nachgewiesen werden.

Literatur

Babbitt, P.C., West, B.L., Buechter, D.D., Kuntz, I.D. und Kenyon, G.L. [1990]: Removal of a proteolytic activity associated with aggregates formed from expression of creatine kinase in *Escherichia coli* leads to improved recovery of active enzyme. *Bio/Technology* 8, 945-949.

Baur, A., Buschinger, A. und Zimmermann, F.K. (1993): Molecular cloning and sequencing of 18S rDNA fragments of six different ant species. *Ins. Soc.* 40, 325-335.

Beuth, J., Ko, H.L., Gabius, H.-J. und Pulverer, G. [1991]: Influence of treatment with the immunomodulatory effective dose of the β -galactoside-specific lectin from Mistletoe on tumor colonization in BALB/c-mice for two experimental model systems. *in vivo* 5, 29-32.

Beuth, J., Ko, H.L., Gabius, H.-J., Burrichter, H., Oette, K. und Pulverer, G. [1992]: Behavior of lymphocyte subsets and expression of activation markers in response to immunotherapy with galactoside-specific lectin from mistletoe in breast cancer patients. *Clin. Investig.* 70, 658-661.

Beuth, J., Ko, H.L., Tunggal, L., Steuer, M.K., Geisel, J., Jeljaszewicz, J. und Pulverer, G. [1993]: Thymocyte proliferation and maturation in response to galactoside-specific Mistletoe Lectin-1. *in vivo* 7, 407-410.

Beuth, J., Ko, K.L., Tunggal, L., Geisel, J. und Pulverer, G. [1993]: Vergleichende Untersuchungen zur immunaktiven Wirkung von Galactosid-spezifischem Mistlektin. *Arzneim. Forsch.* 43, 166-169.

Bocci, V. [1993]: Mistletoe (*Viscum album*) lectins as cytokine inducers and immunoadjuvant in tumor therapy. *J. of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 7, 1-6.

Beuth, J., Ko, H.L., Tungal, L., Buss, G., Jeljaszewicz, J., Steuer, M.K. und Pulverer, G. [1994]: Immunaktive Wirkung von Mistellektin-1 in Abhängigkeit von der Dosierung. Arzneim. Forschung 44, 1255-1258.

Bradford, M.M. [1976]: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248-254.

Dietrich, J.B., Ribéreau-Gayon, G., Jung, M.L., Franz, H., Beck, J.P. und Anton, R. [1992]: Identity of the N-terminal sequences of the three A chains of mistletoe (*Viscum album* L.) lectins: homology with ricin-like plant toxins and single-chain ribosome-inhibiting proteins. Anti-Cancer Drugs 3, 507-511.

Eifler, R., Pfüller, K., Göckeritz, W. und Püller, U. [1994]: Improved procedures for isolation and standardization of mistletoe lectins and their subunits: implications for the analysis of lectin pattern of the european mistletoe. In: Lectins Biology-Biochemistry Clinical Biochemistry (Bog-Hansen, Hrsg.) Vol. 9, M/S Wiley, New Delhi.

Endo, Y., Tsurugi, K. und Franz, H. [1988a]: The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes. The RNA N-glycosidase activity of the protein. FEBS Lett. 231, 378-80.

Endo, Y., Tsurugi, K. und Lambert, J.M. [1988b]: The site of action of six different ribosom-inactivating proteins from plants on eukaryotic ribosomes: the RNA N-glycosidase activity of the proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 150, 1032-1036.

Erlich, H.A., Gelfand, D.H. und Saiki, R.K. [1988]: Specific DNA amplification. Nature 331, 461.

Franz, H., Haustein, B., Luther, P., Kuropka, U. und Kindt, A. [1977]: Isolierung und Charakterisierung von Inhaltsstoffen der Mistel (*Viscum album* L.) I. Affinitätschromatographie an fixierten Plasmaproteinen. Acta biol. med. germ. 36, 113-117.

50

Frohman, M.A., Dush, M.K. und Martin, G.R. [1988]: Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002.

Gabius, H.-J., Walzel, H., Joshi, S.S., Kruip, J., Kojima, S., Gerke, V., Kratzin, H. and Gabius, S. [1992]: The immunomodulatory β -galactoside-specific lectin from Mistletoe: Partial sequence analysis, cell and tissue binding, and impact on intracellular biosignalling of monocytic leukemia cells. Anticancer Res. 12, 669-676.

Gabius, H.-J., Gabius, S., Joshi, S.S., Koch, B., Schroeder, M., Manzke, W.M. und Westerhausen, M. [1993]: From III-defined extracts to the immunomodulatory lectin: Will there be a reason for oncological application of Mistletoe ? Planta Med. 60, 2-7.

Gabius, H.-J. und Gabius, S. [1994]: Die Misteltherapie auf dem naturwissenschaftlichen Prüfstand. PZ 139, 9-16.

Ganguly, C. und Das, S. [1994]: Plant Lectins as inhibitors of tumor growth and modulators of host immune response. Chemotherapy 40, 272-278.

Garcia-Olmedo, F., Carbonero, P., Hernandez-Lucas, C., Paz-Ares, J., Ponz, F., Vicente, O. und Sierra, J.M. [1983]: Inhibition of eukaryotic cell-free protein synthesis by thionins from Wheat endosperm. Biochim. Biophys. Acta 740, 52-56.

Gribskov, M., Devereux, J. und Burgess, R. [1984] Nucl. Acids Res. 12, 539-549.

Hajto, T. [1986]: Immunmodulatory effects of Iscador: A Viscum album preparation. Oncology 43 suppl.1, 51-65.

Hajto, T., Hostanska, K. und Gabius, H.-J. [1989]: Modulatory potency of the β -galactoside-specific lectin from Mistletoe extract (Iscador) on the host defense system in vivo in Rabbits and Patients. Cancer Res. 49, 4803-4808.

Hajto, T., Hostanska, K., Frei, K., Rordorf, C. und Gabis, H.-J. [1990]: Increased secretion of Tumor necrosis factor a, Interleukin 1, and Interleukin 6 by Human Mononuclear Cells exposed to β -Galactoside-specific lectin from clinically applied Mistletoe extract. *Cancer Res.* 50, 3322-3326.

Harlowe, E. und Spur, D. [1988] In: *Antibodies. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Heiny, B.-M. und Beuth, J. [1994]: Mistletoe extract standardized for the galactoside-specific lectin (ML-1) induces β -endorphin release and immunopotentiation in breast cancer patients. *Anticancer Research* 14, 1339-1342.

Hotz, M., Del Bino, G., Lassota, P., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z. [1992] Cytostatic and cytotoxic effects of fostriecin on human promyelocytic HL-60 and lymphocytic MOLT-4 leukemic cells. *Cancer Res.* 52, 1530-1535.

Hülsen, H., Doser, C. und Mechelke, F. [1986]: Differences in the in vitro effectiveness of preparations produced from Mistletoes of various host trees. *Drug. Res.* 36, 433-436.

Jäggy, C., Musielski, H., Urech, K. und Schaller, G. [1995]: Quantitative Determination of lectins in Mistletoe preparations. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 45, 905-909.

Janssen, O., Scheffler, A., und Kabelitz, D. [1993] In vitro Effects of Mistletoe Extracts and Mistletoe Lectins. Cytotoxicity towards tumor cells due to the induction of programmed cell death (apoptosis). *Arzneim. forsch.* 43, 1221-1227

Joller, P.W., Menrad, J.M., Schwarz, T., Pfüller, U., Parnham, M.L., Weyhenmeyer, R. und Lentzen, H. [1996]: Stimulation of cytokine production via a special standardized Mistletoe preparation in an in vitro skin bioassay. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 46, 649-653.

52

Katzin, B.J., Collins, E.J. und Robertus, J.D. [1991]: Structure of Ricin A-Chain at 2.5 Å. Proteins 10, 251-259.

Kim, Y., Misra, D., Monzingo, A.F., Ready, M.P., Frankel, A., und Robertus, J.D. [1992]: Structure of a Ricin mutant showing rescue of activity by a noncatalytic residue. Biochemistry, 31, 3294-3296.

Lord, J.M., Roberts, L.M. und Robertus, J.D. [1994]: Ricin: structure, mode of action, and some current applications. FASEB J. 8, 201-208.

Männel, D.N., Becker, H., Gundt, A., Kist, A. und Franz, H. [1991]: Induction of tumor necrosis factor expression by a lectin from *Viscum album*. Cancer Immunol. Immunother. 33, 177-182.

Minowada, J., Ohnuma, T., Moore, G.E. [1972] Rosette-forming human lymphoid cell lines. J. Nat. Cancer Inst. 49, 891-895

Mendez, E., Moreno, A., Colilla, F., Pelaez, F., Limas, G.G., Mendez, R., Soriano, F., Salinas, M. und de Haro, C. [1990]: Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, g-hordothionin, from barley endosperm. Eur. J. Biochem. 194, 533-539.

Moretta, A. et al. [1991] J. Exp. Med. 172, 701-707.

Ribereau-Gayon, G., Jung, M.-L., Beck, J.-P., Anton, R. [1995]: Effect of fetal calf serum on the cytotoxic activity of Mistletoe (*Viscum album* L.) lectins in cell culture. Phytotherapy Res. 9, 336-339.

Rutenber, E. und Robertus, J.D. [1991]: Structure of Ricin B-chain at 2.5 Å resolution. Proteins 10, 260-269.

Scudiero, P.A. et al. [1988] Cancer Res. 48, 4827-4823.

Stein, G. und Berg, P.A. [1994]: Non-lectin component in a fermented extract from *Viscum album* L. grown on pines induces proliferation of lymphocytes from healthy and allergic individuals in vitro. Eur. J. Clin. Pharmacol. 47, 33-38.

Stirpe, F., Barbieri, L., Battelli, M.G., Soria, M. und Lappi, D.A. [1992]: Ribosome-inactivating proteins from plants: Present status and future prospects. Bio/Technology 10, 405-412.

Studier, F.W. und Moffart, B.A. [1986]: Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J. Mol. Biol. 189, 113-130.

Tonevitsky, A.G., Rakhmanova, V.A., Agapov, I.I., Shamshiev, A.T., Usacheva, E.A., Prokoph'ev, S.A., Denisenko, O.N., Alekseev, Y. and Pfueler, U. (1995): The interactions of anti-MLI monoclonal antibodies with isoforms of the lectin from Viscum album. Immunol. Lett. 44, 31-4.

Vitetta, E. S., Thorpe, P. E., Uhr, J. W. (1993) Immuno-toxins: magic bullets or misguided missiles? Immunol. Today, 14, 252-259

Weston, S.A., Tucker, A.D., Thatcher, D.R., Derbyshire, D.J. und Pauplit, R.A. [1994]: X-ray structure of recombinant Ricin A-Chain at 1.8 Å resolution. J. Mol. Biol. 244, 410-422.

Patentansprüche

1. Nucleinsäuremolekül, das
 - (a) ein Präproprotein codiert, das nach Reifung die biologische Funktion des Mistellektindimers aufweist und die in Fig. 4c dargestellte Nucleotidsequenz aufweist;
 - (b) ein Fragment des Präproteins gemäß (a) codiert, wobei das Fragment ein biologisch aktiver Bestandteil des Mistellektindimers ist;
 - (c) sich durch die Degeneration des genetischen Codes vom Nucleinsäuremolekül gemäß (a) oder (b) unterscheidet; oder
 - (d) unter stringenten Bedingungen mit dem Nucleinsäuremolekül gemäß (a), (b) oder (c) hybridisiert und die ein Polypeptid mit der in (a) oder (b) angegebenen biologischen Funktion bzw. Aktivität codiert.
2. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei das Fragment die A-Kette des Mistellektins ist, die durch die in Fig. 4a dargestellte Nucleotidsequenz codiert wird.
3. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei das Fragment die B-Kette des Mistellektins ist, die durch die in Fig. 4b dargestellte Nucleotidsequenz codiert wird.
4. Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3, das ein DNA-Molekül ist.
5. Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3, das ein RNA-Molekül ist.
6. Nucleinsäuremolekül, das ein antisense-Strang zu dem Nucleinsäuremolekül nach einem der Anspruch 1 bis 5 ist.
7. Vektor, der mindestens ein Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 6 enthält.

8. Vektor nach Anspruch 7, der sowohl ein Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 2 oder 4 sowie auch ein Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 3 oder 4 enthält.
9. Vektor nach Anspruch 7 oder 8, der ein Expressionsvektor ist.
10. Wirt, der mit mindestens einem Vektor nach einem der Ansprüche 7 bis 9 transformiert ist.
11. Wirt nach Anspruch 10, der eine Säugerzelle, eine Pflanzenzelle, ein Bakterium, eine Pilzzelle, eine Hefezelle, ein Insektenzelle oder eine transgene Pflanze ist.
12. Wirt nach Anspruch 11, wobei das Bakterium E. coli ist, die Pilzzelle eine Aspergillus-Zelle und die Insektenzelle eine Spodoptera-Zelle, vorzugsweise eine Spodoptera frugiperda-Zelle ist.
13. Polypeptid, das von dem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder dem Vektor nach einem der Ansprüche 7 bis 9 codiert wird und/oder vom Wirt nach einem der Ansprüche 10 bis 12 produziert wird.
14. Polypeptid nach Anspruch 13, das mindestens eine chemische oder enzymatische Modifizierung aufweist.
15. Polypeptid nach Anspruch 13 oder 14, das ein Fusionsprotein ist.
16. Polypeptiddimer mit der biologischen Funktion des Mischelktins, wobei das eine Monomere vom Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 2, 4 oder 5 und das zweite Monomere vom Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 3 bis 5 codiert wird.
17. Polypeptiddimer nach Anspruch 16, wobei mindestens eines der Monomere ein Polypeptid nach Anspruch 14 oder 15 ist.

18. Antikörper oder Fragment oder Derivat davon, der bzw. das das Polypeptid nach einem der Ansprüche 13 bis 15 und/oder das Polypeptiddimer nach Anspruch 16 oder 17 spezifisch bindet.
19. Verfahren zur Herstellung des Polypeptids nach einem der Ansprüche 13 bis 15 oder des Polypeptiddimers nach Anspruch 16 oder 17, wobei man den Wirt nach einem der Ansprüche 10 bis 12 unter geeigneten Bedingungen züchtet und das so erhaltene Polypeptid oder Polypeptiddimer isoliert.
20. Immuntoxin, umfassend mindestens ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 13 bis 15 oder ein Polypeptiddimer nach Anspruch 16 oder 17.
21. Arzneimittel, enthaltend das Polypeptid nach einem der Ansprüche 13 bis 15 und/oder das Polypeptiddimer nach Anspruch 16 oder 17, und/oder das Immuntoxin nach Anspruch 20, gegebenenfalls zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger.
22. Primer oder Primerpaar, der/das spezifisch an das Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 5 bzw. an den komplementären Strang dazu hybridisiert.
23. Diagnostische Zusammensetzung mindestens enthaltend
 - (a) das Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 5;
 - (b) einen Primer und/oder ein Primerpaar nach Anspruch 22; und/oder
 - (c) das Polypeptid nach einem der Ansprüche 13 bis 15 und/oder das Polypeptiddimer nach Anspruch 16 oder 17.
24. Pflanzenschutzmittel, enthaltend das Polypeptid nach einem der Ansprüche 13 bis 15 und/oder das Polypeptiddimer nach Anspruch 17 oder 18.

**Fig. 1a
Klonierstrategie**

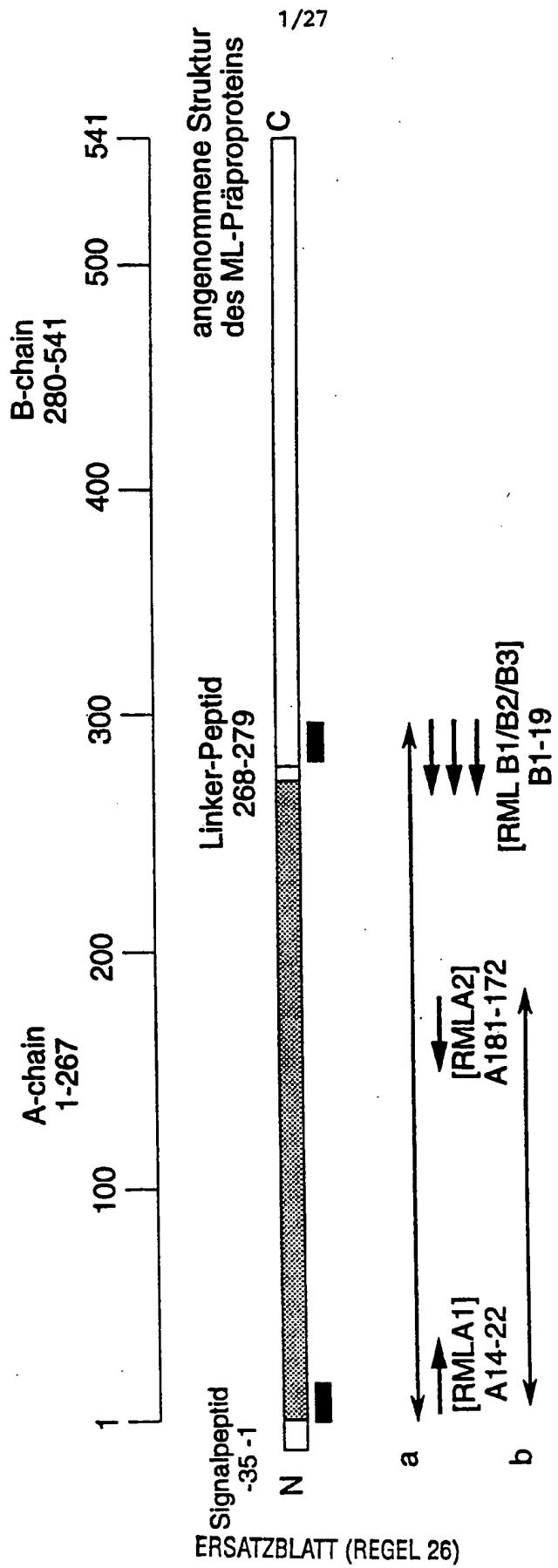


Fig. 1b
**Konstruktion N-terminaler
 A- und B-Ketten Oligonukleotide**

RML A1 (Pos ricA 14-22): N-terminal ML-A-Kette

GAA	TTC	CAC	CAA	ACI	ACI	GGI	GAA	GAA	TAC	TG
H	Q	T	T	G	E	E	Y	F		
T	G					G	G	G	T	

RML B1/B2/B3 N-terminal ML-B-Kette 1-19

RML B1 (m1B 1-7) 2304/9216 Kombinationen
 RML B2 (m1B 8-13) 768 Kombinationen
 RML B3 (m1B 14-19) 768 Kombinationen

Fig 1c Konstruktion des "active site" Oligonukleotids RMLA2

Sequenzvergleich Type-I/II Ribosomen-inaktivierender Proteine (A-Ketten Fragmente Pos. 201-250)

	201	250
T. aestivum	ALYGRTKADK TSGPKQQQAR	EAVT'TLLLKV H...EATRFQ TVSGFVAGVL
H. vulgare	ALHGRTKADK ASGPKQQQAR	EAVT'LLLKV N...EATRFQ TVSGFVAGLL
T-santhin	ALDSAATTLE YYNANSA...	ASALMVLI QSTSEAARYK FIEQQIGKRV
Momordin-a	ALDSAISTLL HYDSTA...	AGALLVLI OTTAEAAFRK YIEQQIQERA
Luffin-a	ALDSAATTLE HYDSTA...	AAAFLVII OTTAEASRFK YIEQQIIERI
Luffin-b	AFDSAITSLF HYDSTA...	AGAFLVII OTTAEASRFK YIEQQIIERI
Momordin-b	ALSSAATTLE YynaQSA...	PSALLVLI OTTAEAAFRK YIERHVAKYV
Ricin	PLEEAISALY YYSTGGTQLP TLARSFIICL	<u>OMISEAARFQ</u> YIEGEMRTRI
RCA	PLEDAISALY YYSTCGTQIP TLARSFMVCI	<u>OMISEAARFQ</u> YIEGEMRTRI
Abrin	ALTHAIS...	FLRGSGASNDE EKARTLIVII OMASEAARYR YISNRVGVSII
MAP	RLEN SIVNI...	YKGAGDV. K QKAFFLLAI QMVSEAAFRK YISDKIPSEK
Saporin-2	LLLTTFMEAV.	NKKARVV. K NEARFLLIAI QMTAEVARFR YIQNLVTKNF
Saporin-6	LLSTSMEAV.	.NKKARVV. K DEARFLLIAI QMTAEAAFR YIQNLVIKNF
Saporin-3	LLSTLMDAV.	.NKKARVV. K NEARFLLIAI QMTAEAAFR YIQNLVTKNF
Dianthin	LLITMIDGV.	.NKKVRVV. K DEARFLLIAI QMTAEAAFR YIQNLVTKNF
PAP-S	ILSSDIGKI.	.SGQGSFTEK LEAKFLLVAI QMVSEAAFRK YIENQVKTNF
cPAP	ILDNSNIGKI.	.SGVMSFTEK TEAEFLLVAI QMVSEAAFRK YIENQVKTNF
a-PAP	ILNSIGIKI.	.YGVDSSFTEK TEAEFLLVAI QMVSEAAFRK YIENQVKTNF

Fig 1c Fortsetzung Konstruktion des "active site" Oligonukleotids RMLA2

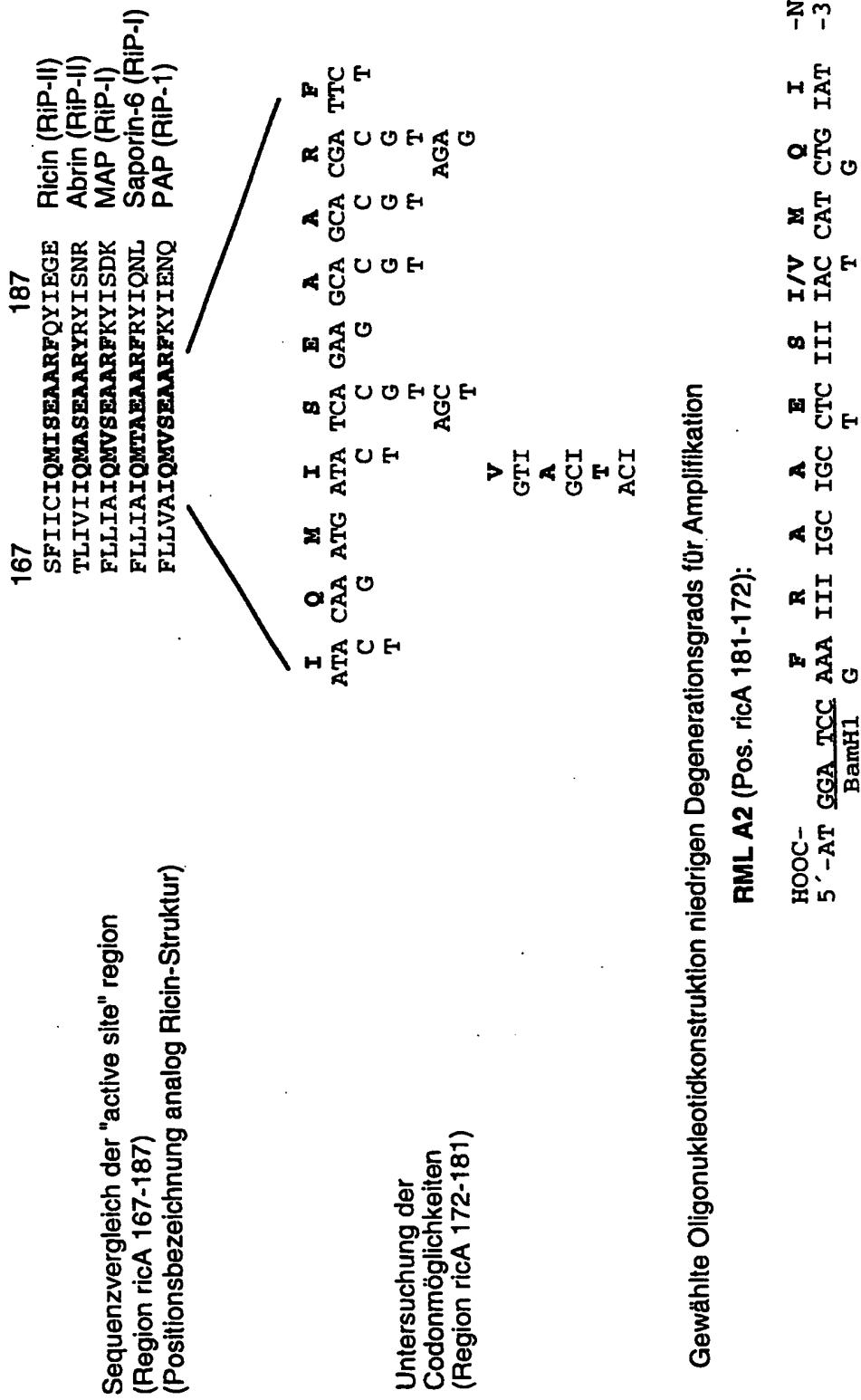
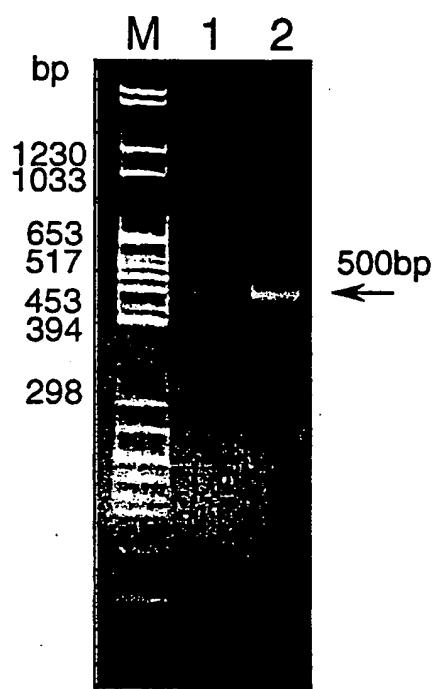


Fig. 2
PCR-Amplifikation von ML-Genfragmenten
aus komplexer genomischer DNA aus
Viscum album



6/27

Fig. 3
Klonierstrategie für rML

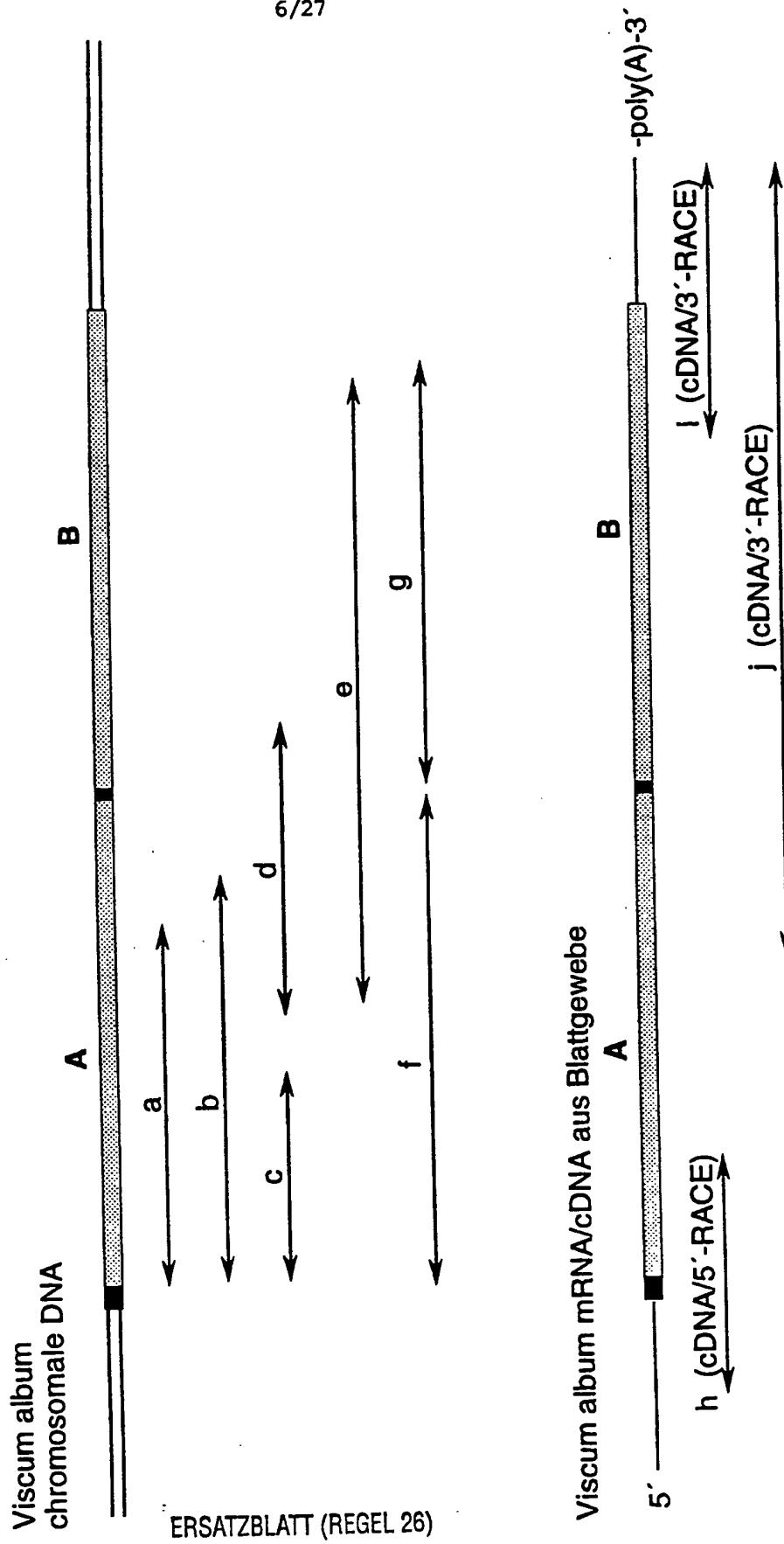


Fig. 4 Rekombinante Insertionen der Expressions- vektoren pT7MLA und pT7MLB

a. MLA

1/1 31/11
CAT ATG TAC GAA CGT ATC CGT CTG CGT GTT ACC CAC CAG ACC ACC GGT GAA GAA TAT TTC
NdeI Met tyr glu arg ile arg leu arg val thr his gln thr thr gly glu glu tyr phe
61/21 91/31
CGG TTC ATC ACG CTT CTC CGA GAT TAT GTC TCA AGC GGA AGC TTT TCC AAT GAG ATA CCA
arg phe ile thr leu leu arg asp tyr val ser ser gly ser phe ser asn glu ile pro
121/41 151/51
CTC TTG CGT CAG TCT ACG ATC CCC GTC TCC GAT GCG CAA AGA TTT GTC TTG GTG GAG CTC
leu leu arg gln ser thr ile pro val ser asp ala gln arg phe val leu val glu leu
181/61 211/71
ACC AAC CAG GGG GGA GAC TCG ATC ACG GCC GCC ATC GAC GTT ACC AAT CTG TAC GTC GTG
thr asn gln gly gly asp ser ile thr ala ala ile asp val thr asn leu tyr val val
241/81 271/91
GCT TAC CAA GCA GGC GAC CAA TCC TAC TTT TTG CGC GAC GCA CCA CGC GGC GCG GAA ACG
ala tyr gln ala gly asp gln ser tyr phe leu arg asp ala pro arg gly ala glu thr
301/101 331/111
CAT CTC TTC ACC GGC ACC ACC CGA TCC TCT CTC CCA TTC AAC GGA AGC TAC CCT GAT CTG
his leu phe thr gly thr arg ser ser leu pro phe asn gly ser tyr pro asp leu
361/121 391/131
GAG CGA TAC GCC GGA CAT AGG GAC CAG ATC CCT CTC GGT ATA GAC CAA CTC ATT CAA TCC
glu arg tyr ala gly his arg asp gln ile pro leu gly ile asp gln leu ile gln ser
421/141 451/151
GTC ACG GCG CTT CGT TTT CCG GGC GGC AGC ACG CGT ACC CAA GCT CGT TCG ATT TTA ATC
val thr ala leu arg phe pro gly gly ser thr arg thr gln ala arg ser ile leu ile
481/161 511/171
CTC ATT CAG ATG ATC TCC GAG GCC GCC AGA TTC AAT CCC ATC TTA TGG AGG GCT CGC CAA
leu ile gln met ile ser glu ala ala arg phe asn pro ile leu trp arg ala arg gln
541/181 571/191
TAC ATT AAC AGT GGG GCG TCA TTT CTG CCA GAC GTG TAC ATG CTG GAG CTG GAG ACG AGT
tyr ile asn ser gly ala ser phe leu pro asp val tyr met leu glu leu glu thr ser
601/201 631/211
TGG GGC CAA CAA TCC ACG CAA GTC CAG CAT TCA ACC GAT GGC GTT TTT AAT AAC CCA ATT
trp gly gln gln ser thr gln val gln his ser thr asp gly val phe asn asn pro ile
661/221 691/231
CGG TTG GCT ATA CCC CCC GGT AAC TTC GTG ACG TTG ACC AAT GTT CGC GAC GTG ATC GCC
arg leu ala ile pro pro gly asn phe val thr leu thr asn val arg asp val ile ala
721/241 751/251
AGC TTG GCG ATC ATG TTG TTT GTA TGC GGA GAG CGG CCA TCT TAA TAG GGA TCC
ser leu ala ile met leu phe val cys gly glu arg pro ser STP STP BamHI

Fig. 4 Rekombinante Insertionen der Expressions- vektoren pT7MLA und pT7MLB

b. MLB

1/1 31/11
CAT ATG GAT GAT GTT ACC TGC AGT GCT TCG GAA CCT ACG GTG CGG ATT GTG GGT CGA AAT
NdeI Met asp asp val thr cys ser ala ser glu pro thr val arg ile val gly arg asn
61/21 91/31
GGC ATG TGC GTG GAC GTC CGA GAT GAC GAT TTC CGC GAT GGA AAT CAG ATA CAG TTG TGG
gly met cys val asp val arg asp asp phe arg asp gly asn gln ile gln leu trp
121/41 151/51
CCC TCC AAG TCC AAC AAT GAT CCG AAT CAG TTG TGG ACG ATC AAA AGG GAT GGA ACC ATT
pro ser lys ser asn asn asp pro asn gln leu trp thr ile lys arg asp gly thr ile
181/61 211/71
CGA TCC AAT GGC AGC TGC TTG ACC ACG TAT GGC TAT ACT GCT GGC GTC TAT GTG ATG ATC
arg ser asn gly ser cys leu thr thr tyr gly tyr thr ala gly val tyr val met ile
241/81 271/91
TTC GAC TGT AAT ACT GCT GTG CCG GAG GCC ACT CTT TGG CAG ATA TGG GGC AAT GGG ACC
phe asp cys asn thr ala val arg glu ala thr leu trp gln ile trp gly asn gly thr
301/101 331/111
ATC ATC AAT CCA AGA TCC AAT CTG GTT TTG GCA GCA TCA TCT GGA ATC AAA GGC ACT ACG
ile ile asn pro arg ser asn leu val leu ala ala ser ser gly ile lys gly thr
361/121 391/131
CTT ACG GTG CAA ACA CTG GAT TAC ACG TTG GGA CAG GGC TGG CTT GCC GGT AAT GAT ACC
leu thr val gln thr leu asp tyr thr leu gly gln gly trp leu ala gly asn asp thr
421/141 451/151
GCC CCA CGC GAG GTG ACC ATA TAT GGG TTC AGG GAC CTT TGC ATG GAA TCA AAT GGA GGG
ala pro arg glu val thr ile tyr gly phe arg asp leu cys met glu ser asn gly gly
481/161 511/171
AGT GTG TGG GTG GAG ACG TGC GTG AGT AGC CAA AAG AAC CAA AGA TGG GCT TTG TAC GGG
ser val trp val glu thr cys val ser ser gln lys asn gln arg trp ala leu tyr gly
541/181 571/191
GAT GGT TCT ATA CGC CCC AAA CAA AAC CAA GAC CAA TGC CTC ACC TGT GGG AGA GAC TCC
asp gly ser ile arg pro lys gln asn gln asp gln cys leu thr cys gly arg asp ser
601/201 631/211
GTT TCA ACA GTA ATC AAT ATA GTT AGC TGC AGC GCT GGA TCG TCT GGG CAG CGA TGG GTG
val ser thr val ile asn ile val ser cys ser ala gly ser ser gly gln arg trp val
661/221 691/231
TTT ACC AAT GAA GGG GCC ATT TTG AAT TTA AAG AAT GGG TTG GCC ATG GAT GTG GCG CAA
phe thr asn glu gly ala ile leu asn leu lys asn gly leu ala met asp val ala gln
721/241 751/251
GCA AAT CCA AAG CTC CGC CGA ATA ATC ATC TAT CCT GCC ACA GGA AAA CCA AAT CAA ATG
ala asn pro lys leu arg arg ile ile ile tyr pro ala thr gly lys pro asn gln met
781/261
TGG CTT CCC GTG CCA TGA TAA GGA TCC
trp leu pro val pro STP STP BamHI

9/27

Fig. 4

Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von Präpromistellektin

C.

1/ 31/
 TTT TAT CTC CTG CCA TCT TCC ATC GGG GAG TCG CCG TGA CAC CAT TCA GGA ACA ATG AAT
 met asn
 61/3 91/13
 GCG GTT ATG GAC TCA AGA AGG GCA TGG GCT TCG TGT TTT TTA ATG CTG GGC CTA GTT TTT
 ala val met asp ser arg arg ala trp ala ser cys phe leu met leu gly leu val phe
 121/23 151/33
 GGT GCG ACG GTC AAA GCG GAA ACC AAA TTC AGC TAC GAG AGG CTA AGA CTC AGA GTT ACG
 gly ala thr val lys ala glu thr lys phe ser tyr glu arg leu arg leu arg val thr
 181/43 211/53
 CAT CAA ACC ACG GGC GAC GAA TAT TTC CGG TTC ATC ACG CTT CTC CGA GAT TAT GTC TCA
 his gln thr thr gly asp glu tyr phe arg phe ile thr leu leu arg asp tyr val ser
 241/63 271/73
 AGC GGA AGC TTT TCC AAT GAG ATA CCA CTC TTG CGT CAG TCT ACG ATC CCC GTC TCC GAT
 ser gly ser phe ser asn glu ile pro leu leu arg gln ser thr ile pro val ser asp
 301/83 331/93
 GCG CAA AGA TTT GTC TTG GTG GAG CTC ACC AAC CAG GGG GGA GAC TCG ATC ACG GCC GCC
 ala gln arg phe val leu val glu leu thr asn gln gly gly asp ser ile thr ala ala
 361/103 391/113
 ATC GAC GTT ACC AAT CTG TAC GTC GTG GCT TAC CAA GCA GGC GAC CAA TCC TAC TTT TTG
 ile asp val thr asn leu tyr val val ala tyr gln ala gly asp gln ser tyr phe leu
 421/123 451/133
 CGC GAC GCA CCA CGC GGC GCG GAA ACG CAT CTC TTC ACC GGC ACC ACC CGA TCC TCT CTC
 arg asp ala pro arg gly ala glu thr his leu phe thr gly thr thr arg ser ser leu
 481/143 511/153
 CCA TTC AAC GGA AGC TAC CCT GAT CTG GAG CGA TAC GCC GGA CAT AGG GAC CAG ATC CCT
 pro phe asn gly ser tyr pro asp leu glu arg tyr ala gly his arg asp gln ile pro
 541/163 571/173
 CTC GGT ATA GAC CAA CTC ATT CAA TCC GTC ACG GCG CTT CGT TTT CCG GGC GGC AGC ACG
 leu gly ile asp gln leu ile gln ser val thr ala leu arg phe pro gly ser thr
 601/183 631/193
 CGT ACC CAA GCT CGT TCG ATT TTA ATC CTC ATT CAG ATG ATC TCC GAG GCC GCC AGA TTC
 arg thr gln ala arg ser ile leu ile leu ile gln met ile ser glu ala ala arg phe
 661/203 691/213
 AAT CCC ATC TTA TGG AGG GCT CGC CAA TAC ATT AAC AGT GGG GCG TCA TTT CTG CCA GAC
 asn pro ile leu trp arg ala arg gln tyr ile asn ser gly ala ser phe leu pro asp
 721/223 751/233
 GTG TAC ATG CTG GAG CTG GAG ACG AGT TGG GGC CAA CAA TCC ACG CAA GTC CAG CAT TCA
 val tyr met leu glu leu glu thr ser trp gly gln gln ser thr gln val gln his ser
 781/243 811/253
 ACC GAT GGC GTT TTT AAT AAC CCA ATT CGG TTG GCT ATA CCC CCC GGT AAC TTC GTG ACG
 thr asp gly val phe asn asn pro ile arg leu ala ile pro pro gly asn phe val thr
 841/263 871/273
 TTG ACC AAT GTT CGC GAC GTG ATC GCC AGC TTG GCG ATC ATG TTG TTT GTA TGC GGA GAG
 leu thr asn val arg asp val ile ala ser leu ala ile met leu phe val cys gly glu
 901/283 931/293
 CGG CCA TCT TCC TCT GAG GTG CGC TAT TGG CCG CTG GTC ATA CGA CCC GTG ATA GCC GAT
 arg pro ser ser ser glu val arg tyr trp pro leu val ile arg pro val ile ala asp
 961/303 991/313
 GAT GTT ACC TGC AGT GCT TCG GAA CCT ACG GTG CGG ATT GTG GGT CGA AAT GGC ATG TGC
 asp val thr cys ser ala ser glu pro thr val arg ile val gly arg asn gly met cys

Fig. 4

10/27

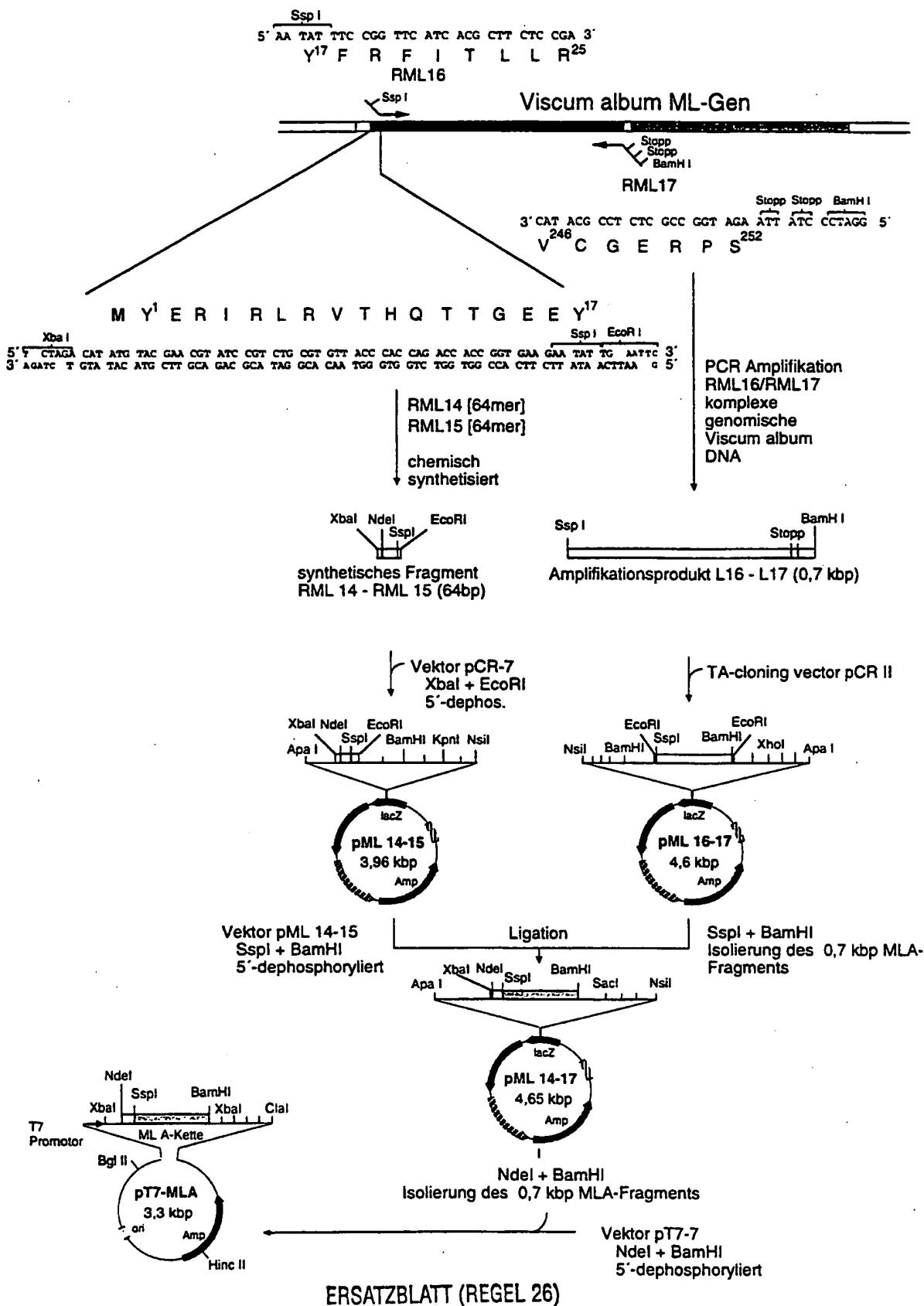
Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von Präpromistellektin

c. Fortsetzung

1021/323	1051/333
GTG GAC GTC CGA GAT GAC GAT TTC CGC GAT GGA AAT CAG ATA CAG TTG TGG CCC TCC AAG	
val asp val arg asp asp phe arg asp gly asn gln ile gln leu trp pro ser lys	
1081/343	1111/353
TCC AAC AAT GAT CCG AAT CAG TTG TGG ACG ATC AAA AGG GAT GGA ACC ATT CGA TCC AAT	
ser asn asn asp pro asn gln leu trp thr ile lys arg asp gly thr ile arg ser asn	
1141/363	1171/373
GGC AGC TGC TTG ACC ACG TAT GGC TAT ACT GCT GGC GTC TAT GTG ATG ATC TTC GAC TGT	
gly ser cys leu thr thr tyr gly tyr thr ala gly val tyr val met ile phe asp cys	
1201/383	1231/393
AAT ACT GCT GTG CGG GAG GCC ACT CTT TGG CAG ATA TGG GGC AAT GGG ACC ATC ATC AAT	
asn thr ala val arg glu ala thr leu trp gln ile trp gly asn gly thr ile ile asn	
1261/403	1291/413
CCA AGA TCC AAT CTG GTT TTG GCA GCA TCA TCT GGA ATC AAA GGC ACT ACG CTT ACG GTG	
pro arg ser asn leu val ala ala ser ser gly ile lys gly thr thr leu thr val	
1321/423	1351/433
CAA ACA CTG GAT TAC ACG TTG GGA CAG GGC TGG CTT GCC GGT AAT GAT ACC GCC CCA CGC	
gln thr leu asp tyr thr leu gly gln gly trp leu ala gly asn asp thr ala pro arg	
1381/443	1411/453
GAG GTG ACC ATA TAT GGG TTC AGG GAC CTT TGC ATG GAA TCA AAT GGA GGG AGT GTG TGG	
glu val thr ile tyr gly phe arg asp leu cys met glu ser asn gly gly ser val trp	
1441/463	1471/473
GTG GAG ACG TGC GTG AGT AGC CAA AAG AAC CAA AGA TGG GCT TTG TAC GGG GAT GGT TCT	
val glu thr cys val ser ser gln lys asn gln arg trp ala leu tyr gly asp gly ser	
1501/483	1531/493
ATA CGC CCC AAA CAA AAC CAA GAC CAA TGC CTC ACC TGT GGG AGA GAC TCC GTT TCA ACA	
ile arg pro lys gln asn gln asp gln cys leu thr cys gly arg asp ser val ser thr	
1561/503	1591/513
GTA ATC AAT ATA GTT AGC TGC AGC GCT GGA TCG TCT GGG CAG CGA TGG GTG TTT ACC AAT	
val ile asn ile val ser cys ser ala gly ser ser gly gln arg trp val phe thr asn	
1621/523	1651/533
GAA GGG GCC ATT TTG AAT TTA AAG AAT GGG TTG GCC ATG GAT GTG GCG CAA GCA AAT CCA	
glu gly ala ile leu asn leu lys asn gly leu ala met asp val ala gln ala asn pro	
1681/543	1711/553
AAG CTC CGC CGA ATA ATC ATC TAT CCT GCC ACA GGA AAA CCA AAT CAA ATG TGG CTT CCC	
lys leu arg arg ile ile tyr pro ala thr gly lys pro asn gln met trp leu pro	
1741/563	1771/573
GTG CCA TGA TTT AGG TTC ATG GCT CGA AGA TTG CTT GCA TGC GAC CAT CCT TTC TAT TTT	
val pro STP	
1801/	1831/
CTC TTT TCT ACC TTT TGA AAT AAT GTC TGT GAA TAA TGT GGC ACG TTG AGG CCC GCC GAA	
1861/	1891/
AGA AGC CTT AGC CAC CTT GTG TTT GAG AAT AAA TGA GTT AAT GCA AGC AAT CAA CTT CTC	
1921/	
CTT	

Die Sequenz ist abgeleitet von den klonierten ML-Genfragmenten "h" (Nucleotide 1 - 204), "f" (Nucleotide 205 - 909), "e" (Nucleotide 910 - 957), "g" (Nucleotide 958 - 1746) und "i" (Nucleotide 1747 - 1923)

Fig. 5
Konstruktion des MLA-Expressionsvektors pT7-MLA



ERSATZBLATT (REGEL 26)

12/27

**Fig. 5 Fortsetzung
Konstruktion des MLA-Expressionsvektors pT7-MLA**

**Amplifikation eines
MLA-Fragments**

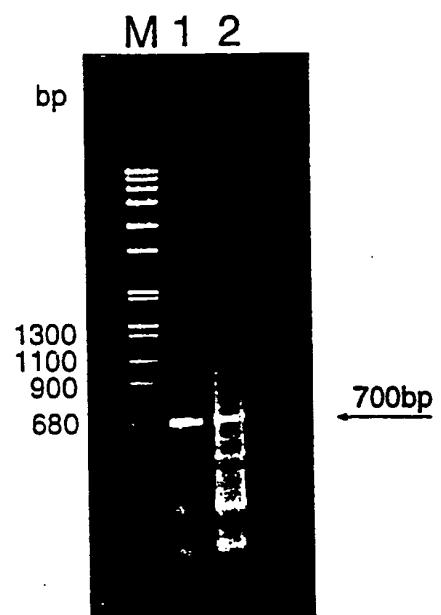


Fig. 6 Konstruktion des ML-B Expressionsvektors pT7-MLB

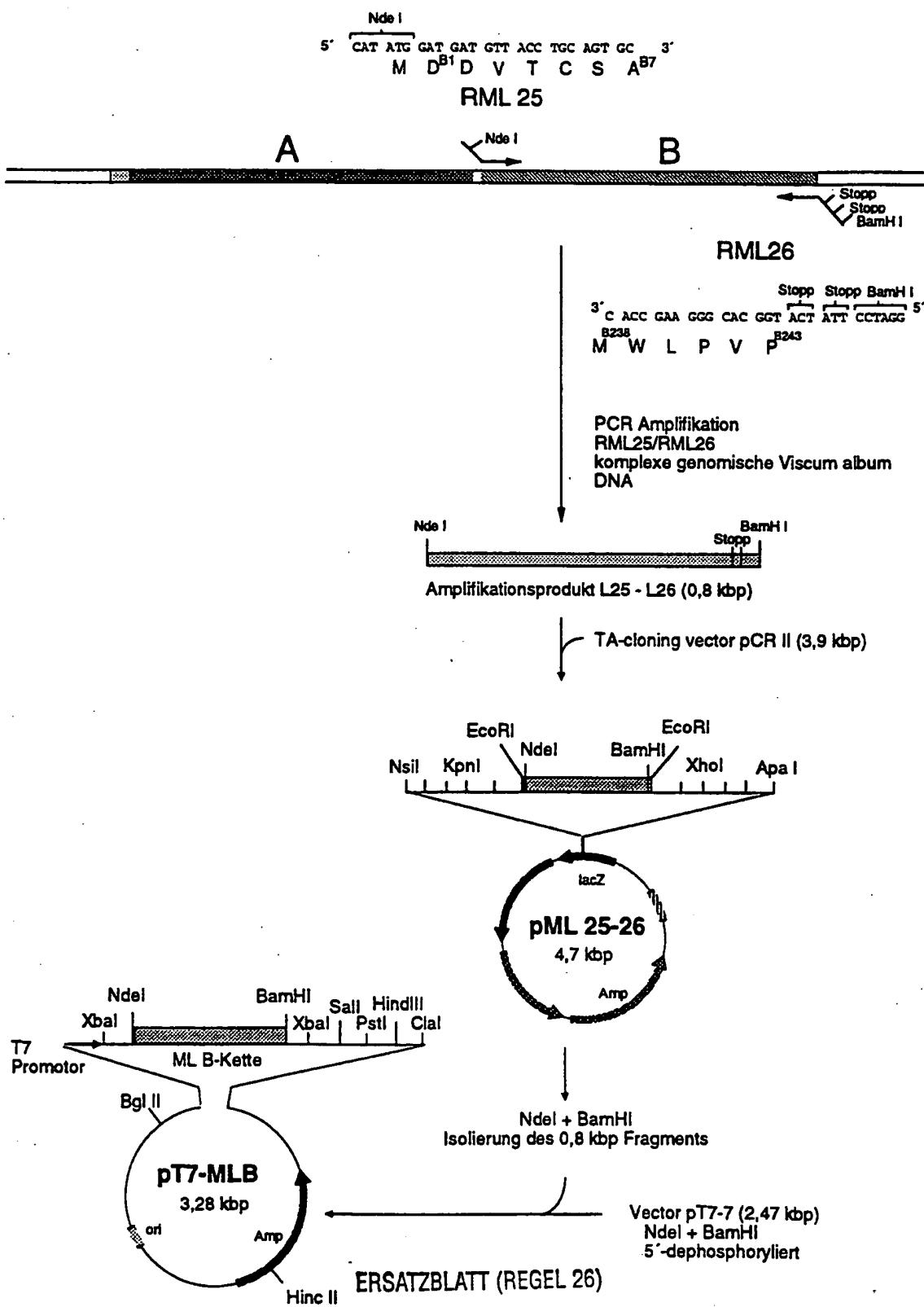
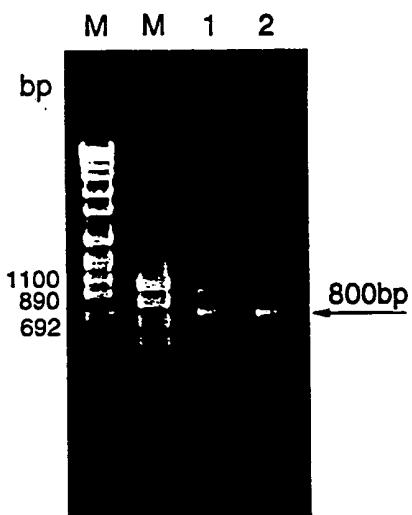


Fig. 6 Fortsetzung
Konstruktion des ML-B Expressionsvektors pT7-MLB

14/27

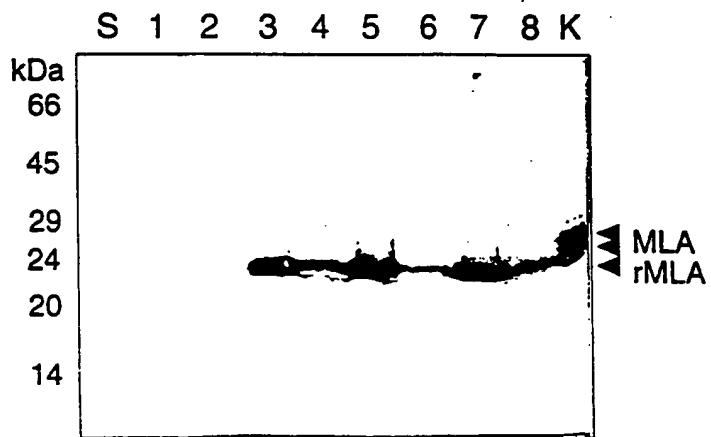
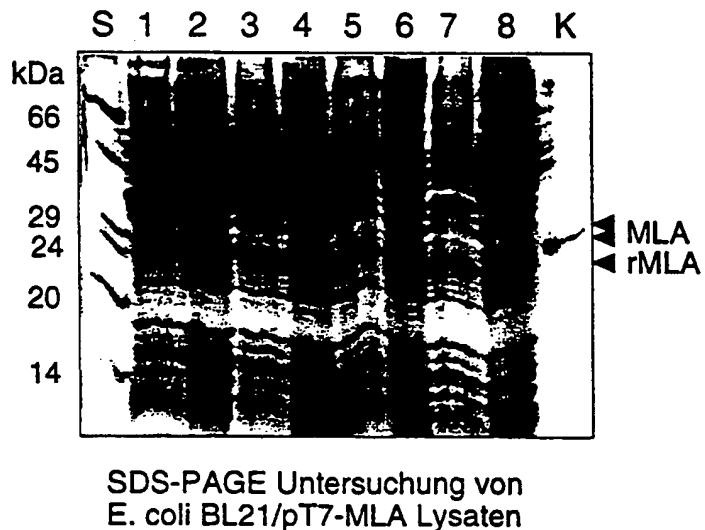
**Amplifikation eines
MLB-Fragments**



15/27

Fig. 7:
Expression von rMLA und rMLB

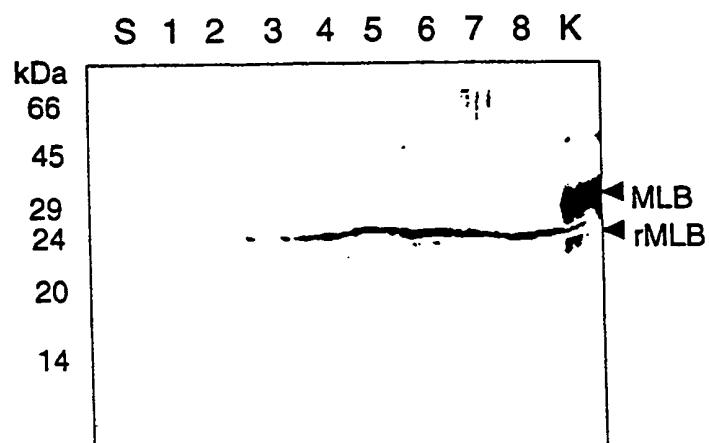
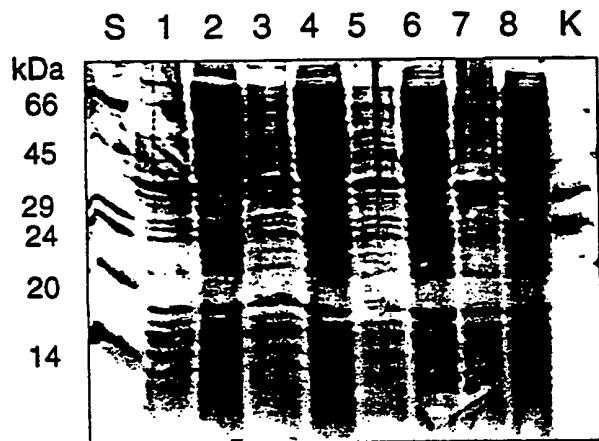
a.: Expression der rMLA-Kette



Immunologische Detektion
von rMLA (Western Blot)

**Fig. 7 Fortsetzung
Expression von rMLA und rMLB**

b.: Expression der rMLB-Kette



17/27

Fig. 8
Isoelektrische Chromatofokussierung von rMLA and rMLB vs. MLA, MLB und ML-1 Holoprotein

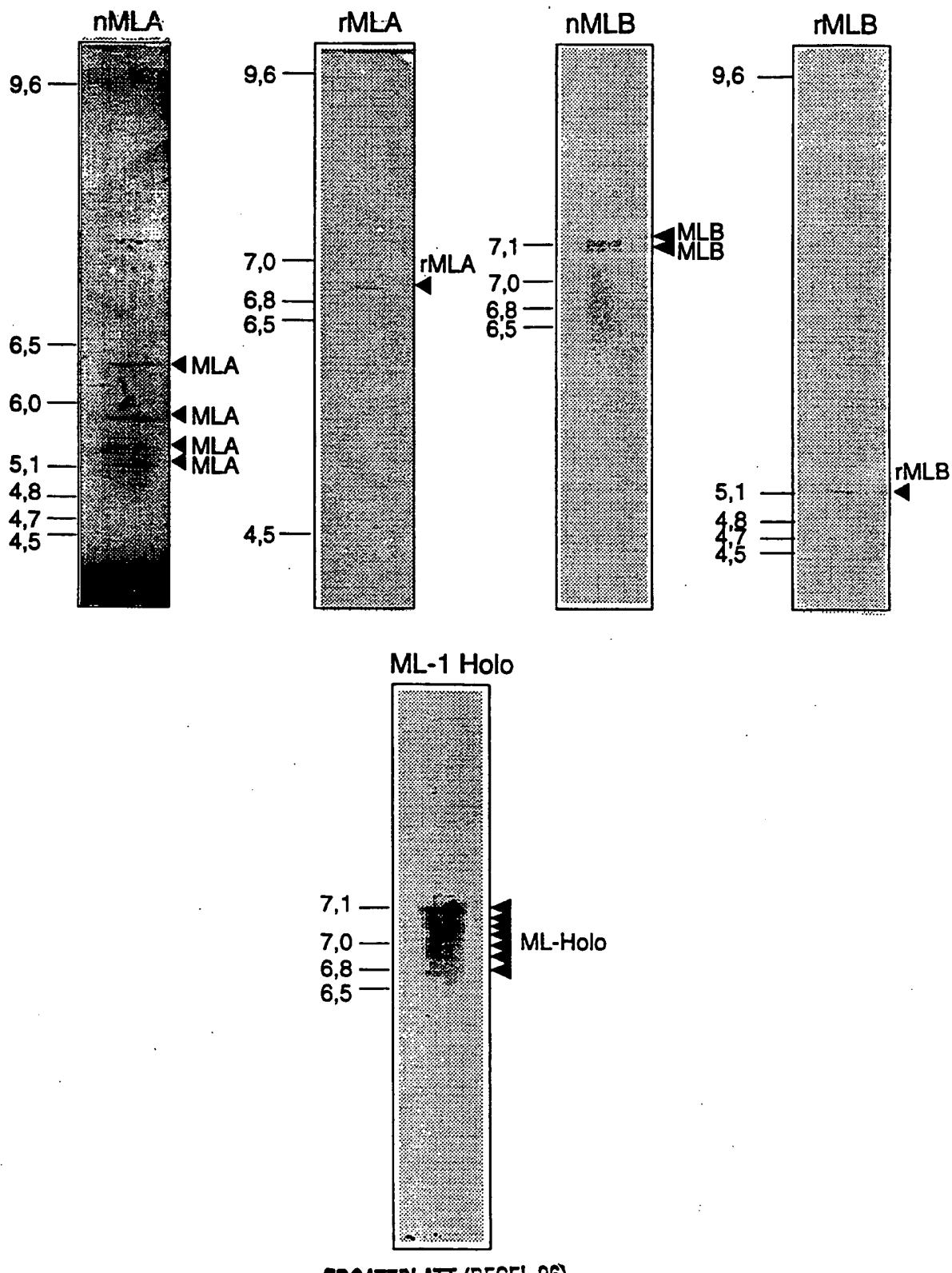
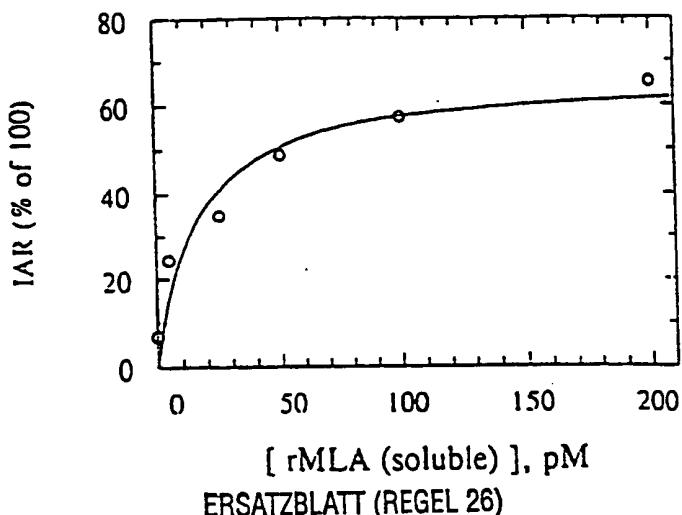
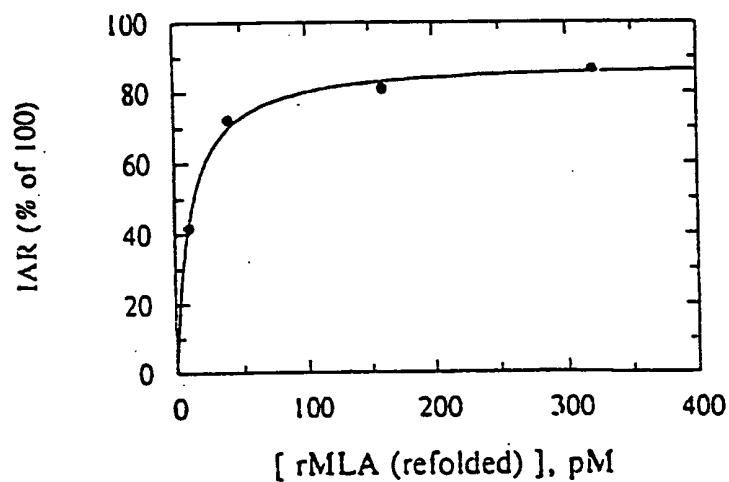
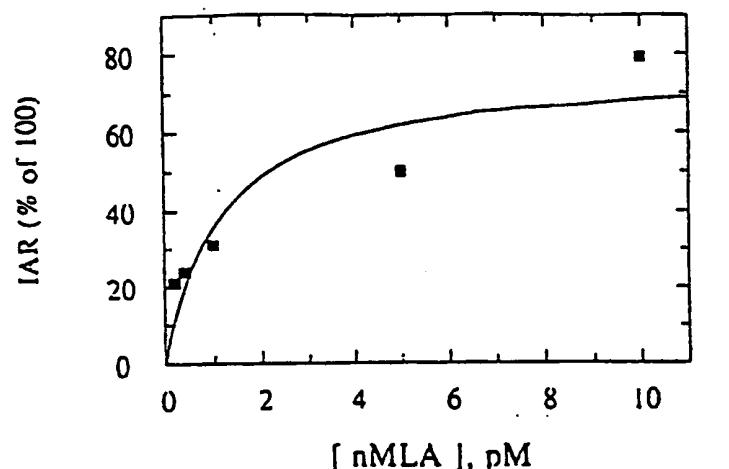
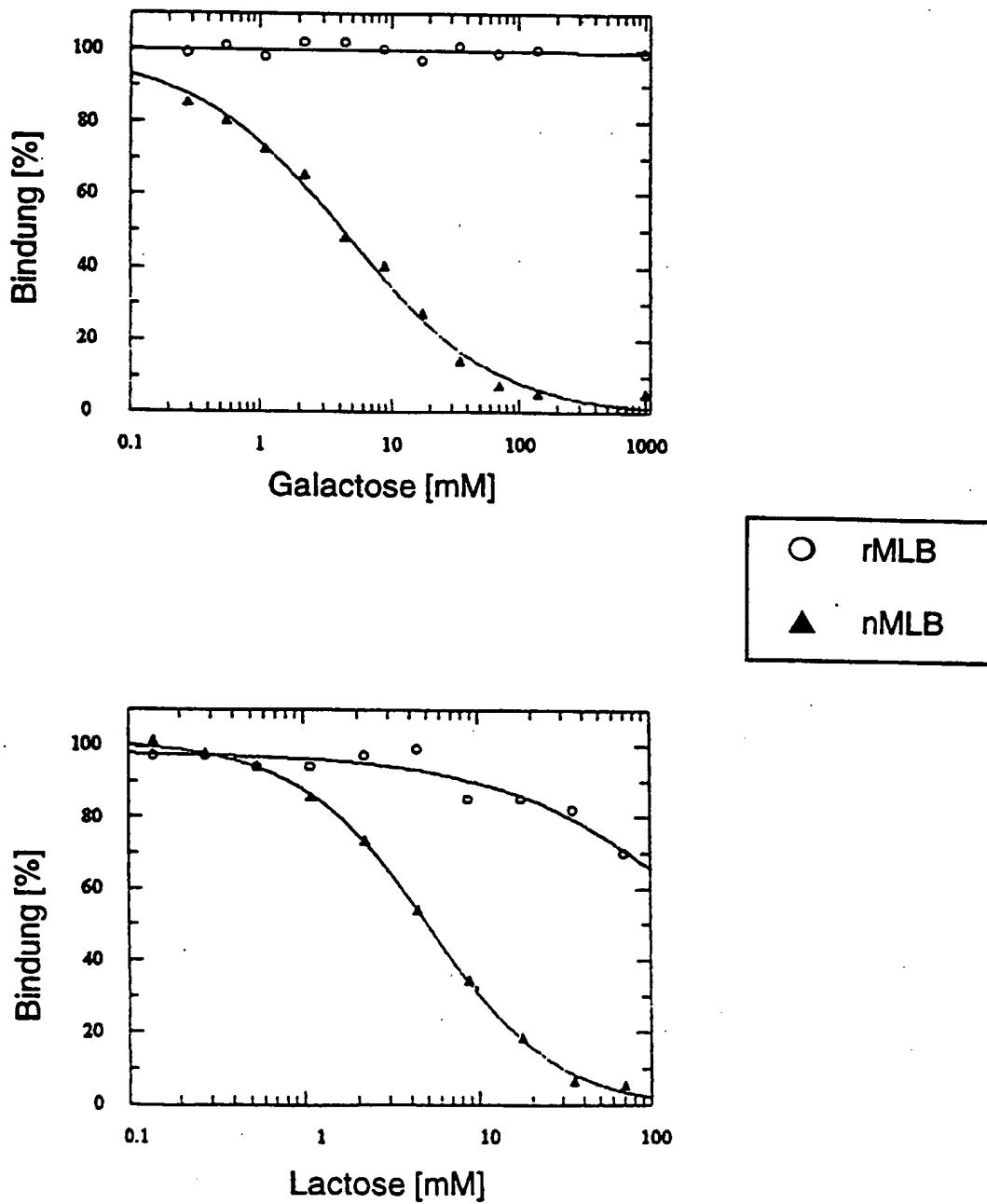


Fig. 9
Enzymatische Aktivität von rMLA

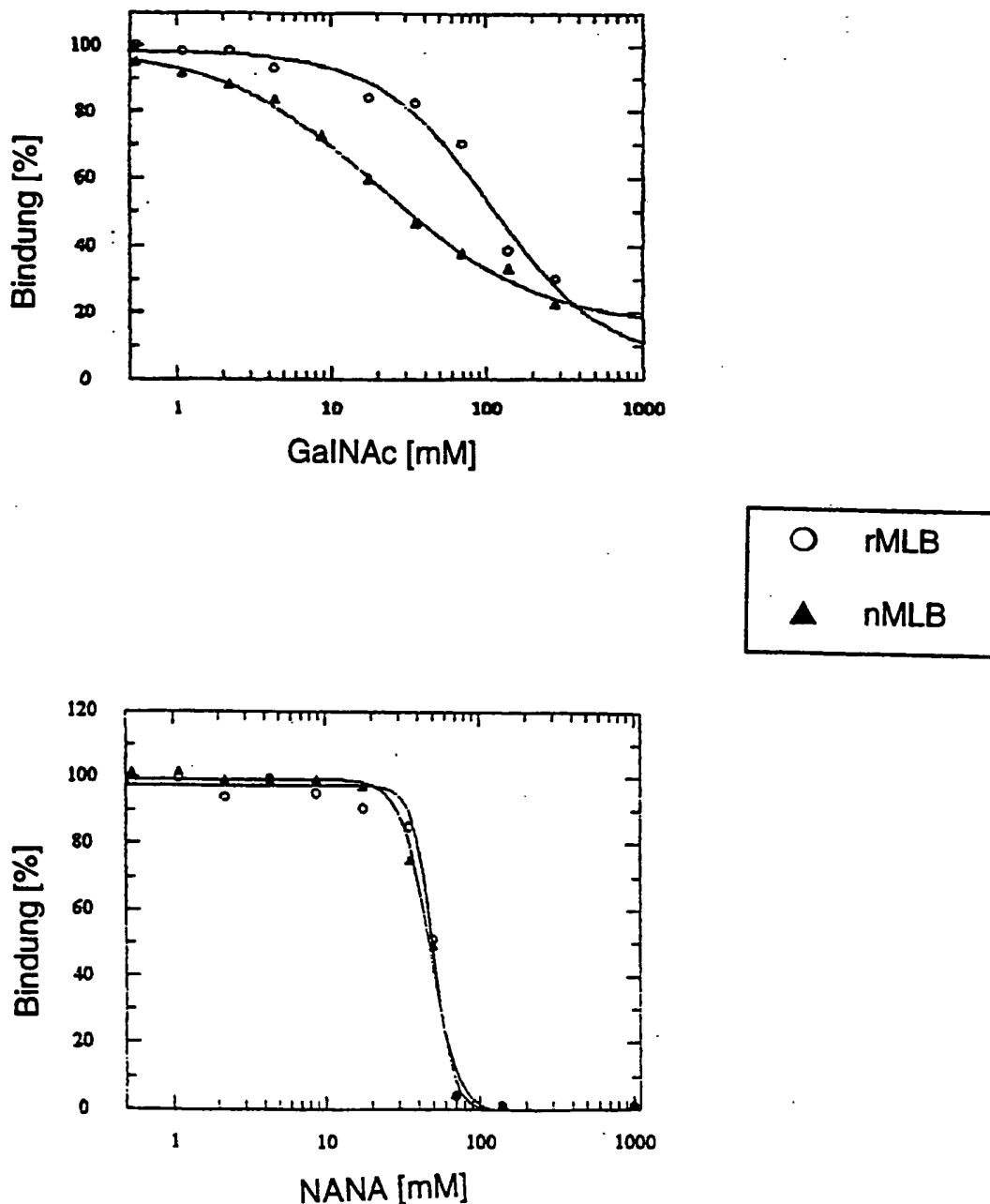


19/27

Fig. 10
Carbohydrat-Bindecharakteristik von rMLB



**Fig. 10 Fortsetzung
Carbohydrat-Bindecharakteristik von rMLB**

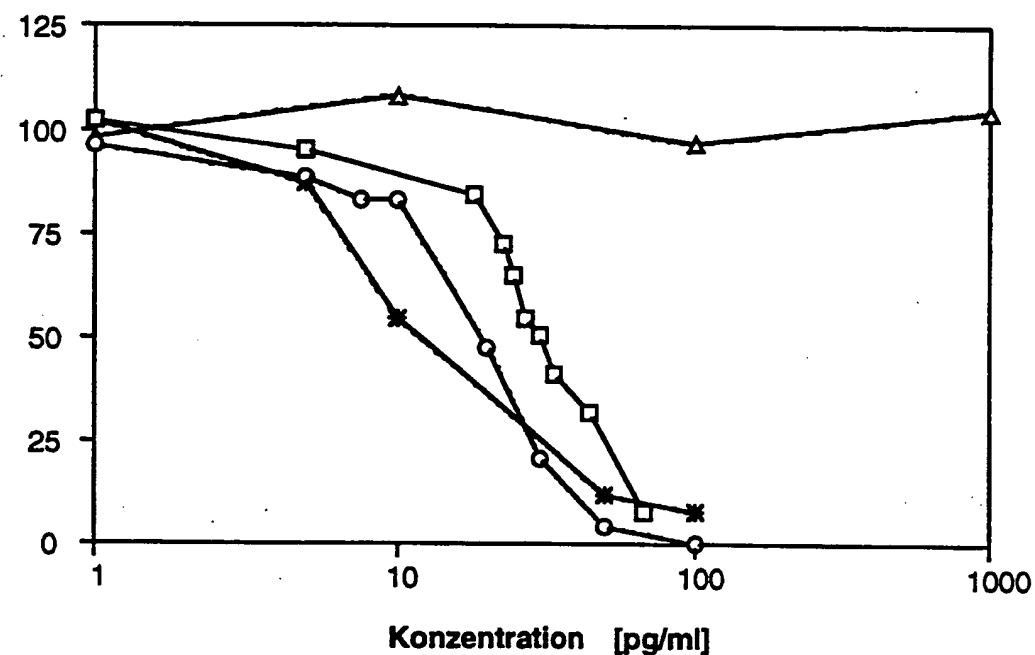


21/27

Fig. 11
MOLT4-Zytotoxizität von rML

Viabilität

[% Kontrolle]



—□— rML Holoprotein —○— ML-1 Holoprotein #220793
—△— rMLB —*— rMLA/nMLB

22/27

Fig. 12
Apoptose-Induktion bei U937 Zellen

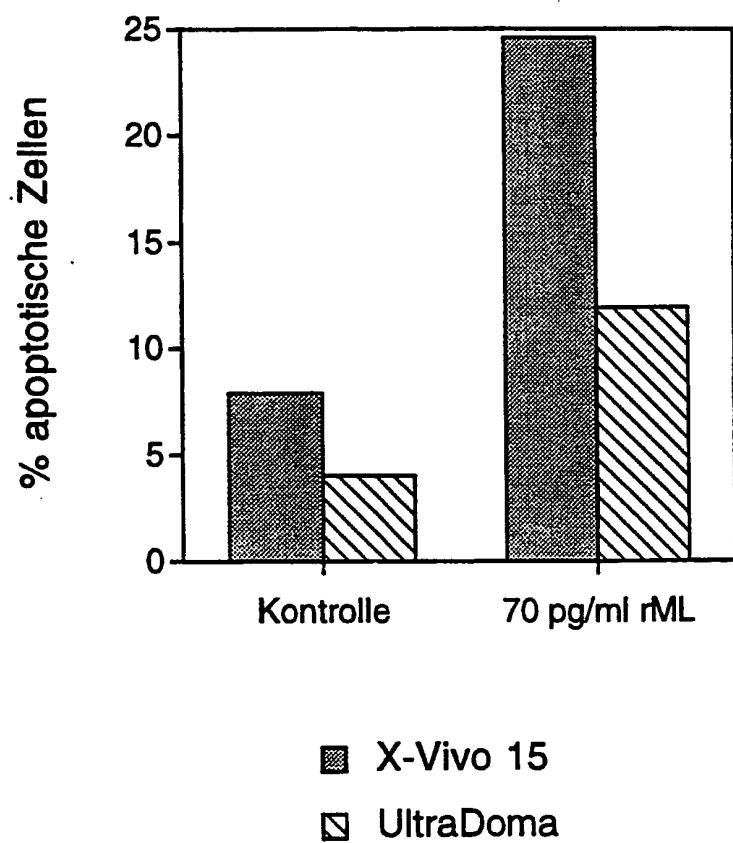
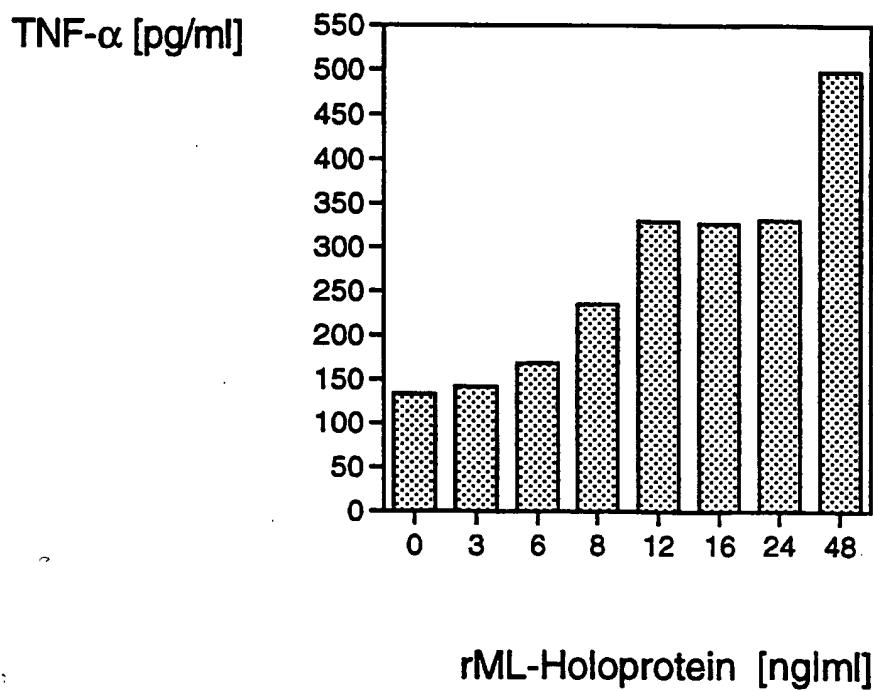


Fig. 13
Immunstimulierende Wirkung von
rekombinantem Mistellektin im
PBMC-Modell

a. Induktion der Freisetzung von TNF- α



**Fig. 13 Fortsetzung
Immunstimulierende Wirkung von
rekombinantern Mistellektin im
PBMC-Modell**

b. Induktion der Freisetzung von IFN- γ

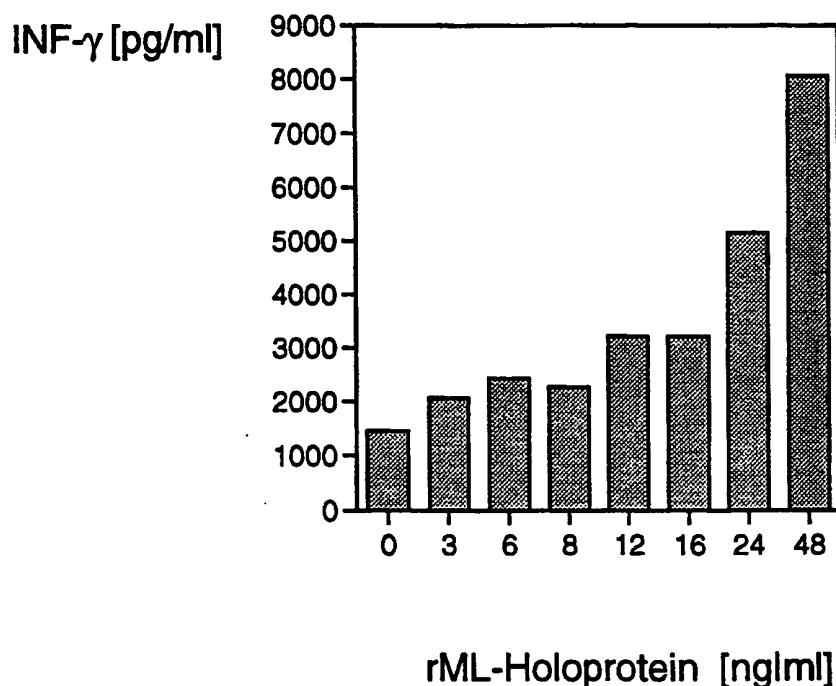
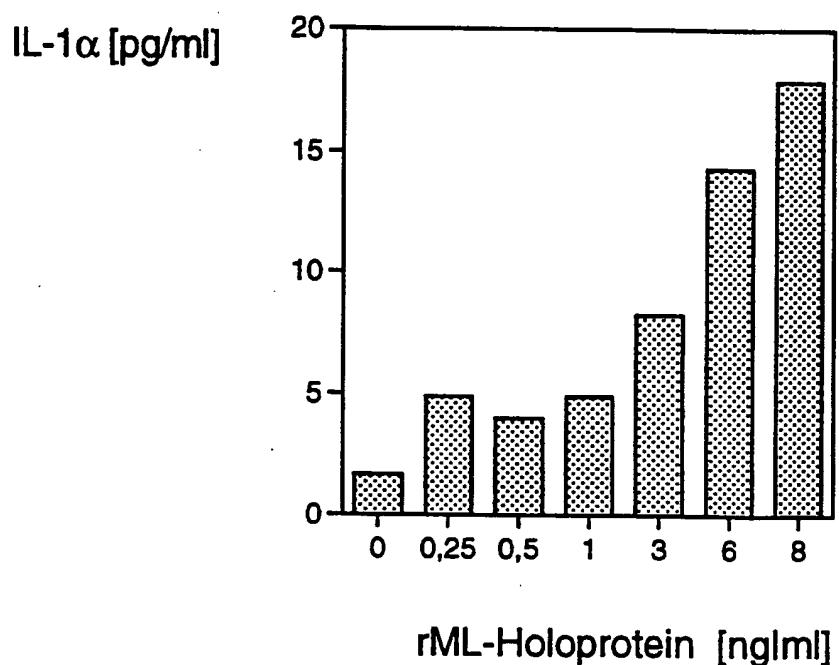


Fig. 14
**Immunstimulierende Wirkung von
rekombinantem Mistellektin im
skin²-ZK1200 Modell**

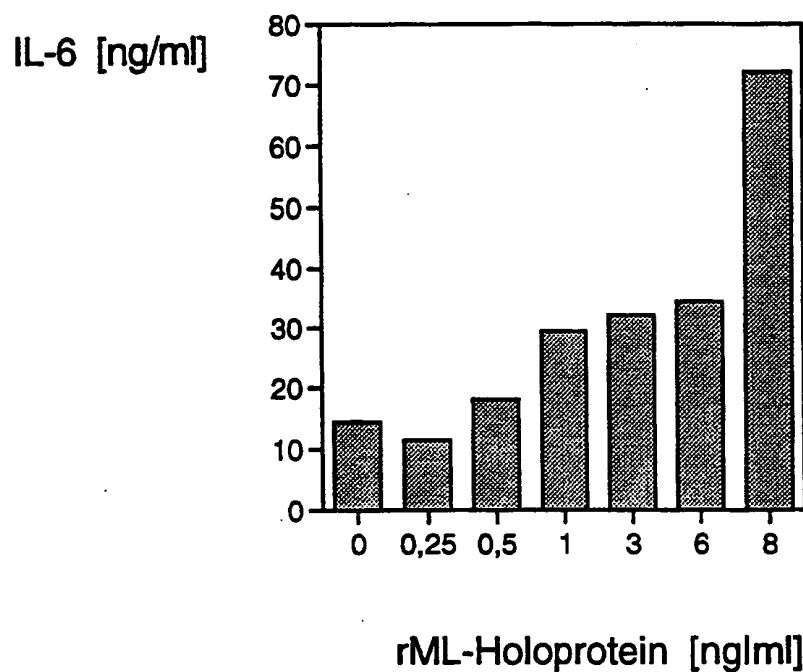
a. Induktion der Freisetzung von IL-1 α



26/27

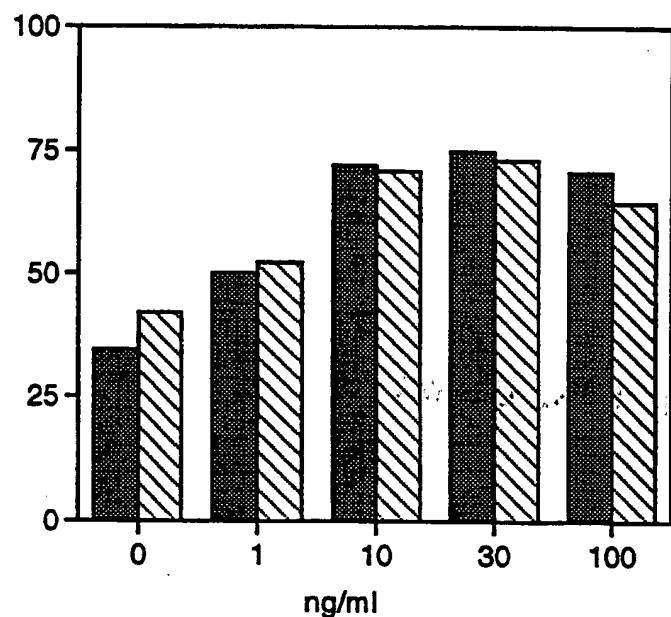
**Fig. 14 Fortsetzung
Immunstimulierende Wirkung von
rekombinantem Mistellektin im
skin²-ZK1200 Modell**

b. Induktion der Freisetzung von IL-6



27/27

Fig. 15
CD69-Induktion durch rMLB bei PBMC



■ mittlere Fluoreszenz [rel. Einheiten]

▨ pos. Zellen [%]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
(DT980) (DT980) (DT980) (DT980)
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)